

Ezrin/F-Aktin und Signaltransduktion

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
doctor rerum naturalium

angefertigt am
Leibniz Institut für Altersforschung – Fritz Lipmann Institut

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich Schiller Universität Jena

von Diplom-Biologin Ulrike Merkel
geboren am 25. August 1965 in Heidelberg

1. Gutachter: Professor Dr. P. Herrlich
2. Gutachter: Professor Dr. M. Stubbs
3. Gutachter: Dr. habil. I. Rubio
4. Gutachter: Professor Dr. C. O. Hanemann

Termin der Disputation: 17. September 2008

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
1 Zusammenfassung / Abstract	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Ras	4
2.1.1 Ras in der MAP-Kinase Signal-Kaskade	6
2.2 SOS	8
2.3 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	9
2.4 Ko-Rezeptoren	10
2.4.1 CD44	11
2.4.1.1 Der CD44 N-terminale Teil und die Stamm-Region . . .	11
2.4.1.2 Der CD44 C-terminale Teil	12
2.5 Ezrin	13
2.5.1 Das Ezrin-Gen	13
2.5.2 ERM-Proteine	13
2.5.3 Die Struktur der ERM-Proteine	14
2.5.4 Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung	16
2.6 Ziel der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Chemikalien	19
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3 Bakterien und eukaryotische Zellen	22
3.1.4 Plasmide	23
3.1.5 DNA-Konstrukte	23
3.1.6 Oligonukleotide	23
3.1.6.1 DNA	23
3.1.6.2 siRNA	24
3.1.7 Enzyme	25

3.1.8	Antikörper	25
3.1.8.1	Primäre Antikörper	25
3.1.8.2	Sekundäre Antikörper	26
3.1.8.3	Fluoreszenz-Antikörper	26
3.1.9	GST-Fusionsproteine	26
3.1.10	Puffer und Lösungen	27
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkulturbedingungen	30
3.2.2	Splitten und Passagieren von adhären- ten Zellen	30
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	30
3.2.4	Einfrieren von Zellen	30
3.2.5	Auftauen von Zellen	30
3.2.6	Herstellung chemisch kompetenter Bak- terien zur Transformation	31
3.2.7	Transformation von DNA in chemisch kompetente Zellen	31
3.2.8	Herstellung der Agar-Platten zum Aus- streichen der Bakterien	32
3.2.9	Herstellung kleiner Mengen Plasmid DNA (Minipräparation)	32
3.2.10	Herstellung größerer Mengen Plasmid DNA (Maxipräparation)	32
3.2.11	Isolieren von Plasmid DNA mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen	32
3.2.12	Gelelektrophorese von DNA-Agarose- gelen	32
3.2.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
3.2.14	Bestimmung der DNA-Konzentration	33
3.2.15	Ligation	33
3.2.16	Austausch einer Nukleotids („Site directed mutagenesis“)	33
3.2.17	Transfektion eines induzierbaren Sys- tems in NIH3T3-Zellen	33
3.2.18	Verringerung der Proteinmenge mittels siRNA	33
3.2.19	Langzeit-Messung der Proliferation	34
3.2.20	Immunofluoreszenz-Mikroskopie	34
3.2.20.1	Herstellen der Paraformaldehyd-Lösung in modifiziertem Zytoskelett Puffer pH 7,0	34
3.2.20.2	Fixieren und Permeabilisieren der Zellen	34
3.2.20.3	BrdU Immunofluoreszenz-Mikrosko- pie	34
3.2.20.4	Phalloidin Immunofluoreszenz-Mikro- skopie	35
3.2.21	Zellfraktionierung für SDS-PAGE	35
3.2.22	Immunopräzipitation (IP)	36
3.2.23	Herstellung von GST Fusionsproteinen	37
3.2.24	Abspalten der GST-Sequenz von GST- Fusionproteinen	37
3.2.25	GST Pulldown	38
3.2.25.1	GST-Ezrin oder GST-Ras Pulldown	38

3.2.25.2	Beladen von GST-Ras mit GDP bzw. GTP	38
3.2.26	Ras-Aktivierungs-Assay	39
3.2.27	Luziferase-Assay	39
3.2.28	Gelelektrophorese von Proteinen in SDS-Gelen	40
3.2.29	Färben von SDS-Gelen (kolloidales Coomassie)	40
3.2.30	Western-Blot und immunochemische Detektion von Proteinen . .	40
3.2.31	Entfernen von sekundären Antikörpern von einer Membran (Strip- pen)	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Ein ERM Knock Down führt zu Inhibierung der Ras-Aktivierung	43
4.2	ERM-Proteine sind in Komplexen zu finden	43
4.2.1	ERM-Proteine bilden zusammen mit Ras und SOS einen Komplex	43
4.2.2	Integrin β -1 befindet sich in einem Komplex zusammen mit Ezrin	44
4.3	Ein Integrin β -1 Knock Down führt zur verminderten Antwort im Ras/MAP- Kinase Signalweg	45
4.4	Das N-terminale Ende von Ezrin hat strukturelle Ähnlichkeiten mit einer Raf-Ras-Bindedomäne	46
4.5	N-terminales Wildtyp-Ezrin kann an Ras binden	47
4.6	Eine Mutation im N-Terminus von Ezrin kann die Bindung an Ras inhi- bieren	48
4.7	Eine Mutation im N-Terminus hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Ezrin in der Zelle	49
4.8	Ezrin R40L vermindert die Aktivierung von Ras	51
4.9	Die Proliferation der Ezrin-Mutante R40L ist vermindert	52
4.10	Wildtyp-Ezrin, aber nicht Ezrin R40L, kann an GDP-Ras binden	52
4.11	Ein Src-Motiv kann für die Myristoylierung (Membranbindung) verwen- det werden	54
4.12	Die Lipidmodifizierung von Ezrin hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ezrin in der Membran	55
4.13	Membrangebundenes Wildtyp-Ezrin aktiviert den Ras/MAP-Kinase Si- gnalweg auch ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren	57
4.14	Src-Ezrin aktiviert trotz fehlender Wachstumsfaktoren die Bildung von Ras-GTP	59
4.15	Die Proliferation von Src-Ezrin exprimierenden Zellen ist in Hungerme- dium erhöht	60
4.16	In Src-Ezrin transfizierten Zellen hat ein reduziertes Level an Integrin β -1 keinen Einfluss auf die Aktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs . .	62

4.17	Das Fehlen der FERM-Domäne hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Src-Ezrin α h/ct	63
4.18	Src-Ezrin α h/ct inhibiert die Bildung von GTP-Ras	64
4.19	Zellen, welche exogenes Src-Ezrin α h/ct überexprimieren, besitzen eine verminderte Teilungsfähigkeit	65
5	Diskussion	67
5.1	ERM-Proteine und deren Bindung an Ko-Rezeptoren sind wichtige Komponenten in der Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs	67
5.2	Die direkte Bindung von GDP-Ras an den Ezrin ist essentiell für die Aktivierung von Ras	70
5.3	Die direkte Membranbindung von Ezrin erlaubt eine dominant aktive Signalkaskade	72
5.4	Membrangebundenes Ezrin benötigt den N-Terminus um den Ras/MAP-Kinase Signalweg zu aktivieren	72
6	Literaturverzeichnis	74
A	Anhang	87
A.1	Allgemeine Abkürzungen	87
A.2	Aminosäuren	88
A.3	Selbständigkeitserklärung	89
A.4	Danksagung	90
A.5	Lebenslauf	91
A.6	Poster-Präsentationen	93
A.7	Vorträge & Veröffentlichungen	93

Abbildungsverzeichnis

2.1	Die klassische Ras-Aktivierung	3
2.2	Die Lokalisation von Ras-Isoformen	4
2.3	Die Lipidmodifikation der verschiedenen Ras-Isoformen	5
2.4	Verschiedene MAP-Kaskaden in Mammalia.	6
2.5	Schematische Darstellung der switch 1 / switch 2 Regionen	7
2.6	Die Proteinstruktur von SOS	8
2.7	Schematische Aktivierung von SOS	9
2.8	Übersicht Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	10
2.9	RTK am Beispiel des PDGF-Rezeptors	11
2.10	CD44	12
2.11	Ezrin Funktion im Ras Signalweg.	14
2.12	Band 4.1 Proteine im Vergleich	15
2.13	Der strukturelle Aufbau der FERM-Domäne.	16
4.1	ERM Knock Down	43
4.2	Ko-Immunopräzipitation gegen SOS	45
4.3	IP gegen PDGF-Rezeptor	45
4.4	ITG β -1 knock down	46
4.5	ERM FERM-Domäne	46
4.6	Struktur von Ezrin-Terminus und Raf-Ras-Bindedomäne	47
4.7	a) GST-N-term Ezrin Pulldown; b) GST-N-term Ezrin/GST-Ras Pulldown	48
4.8	GST-N-term Ezrin R40L Pulldown	49
4.9	a) Zellfraktionierung von Wildtyp-Ezrin; b) Zellfraktionierung der Ezrin Mutante R40L	49
4.10	Fluoreszenz-Mikroskopie von Wildtyp-Ezrin	50
4.11	Fluoreszenz-Mikroskopie der Ezrin Mutante R40L	50
4.12	Ras-Aktivierungs-Assay mit Wildtyp-Ezrin und Ezrin R40L	51
4.13	a) Kurzeit-Messung der Proliferation von Ezrin wildtyp exprimierenden Zellen; b) Kurzeit-Messung der Proliferation von Ezrin R40L exprimie- renden Zellen	53
4.14	GDP/GTP-Ras-GST Pull Down mit Wildtyp-Ezrin und Ezrin R40L . .	54
4.15	Prinzip der Myristoylierung	55

4.16	Zellfraktionierung von Src-Ezrin-transfizierten Zellen	56
4.17	Fluoreszenz-Mikroskopie von myristoyliertem Ezrin (Src-Ezin)	56
4.18	a) Ras-MAP-Kinase Reporter-Assay in Vollmedium; b) Ras-MAP-Kinase Reporter-Assay in Hungermedium	58
4.19	Ras-Aktivierungs-Assay mit Wildtyp-Ezrin und lipidmodifiziertem Ezrin	59
4.20	a) Messung der Proliferation in Vollmedium; b) Messung der Proliferation in Hungermedium	61
4.21	a) ITG β -1 Knock Down in Ezrin ko-transfizierten NIH3T3; b) ITG β -1 Knock Down in Src-Ezrin ko-transfizierten NIH3T3	62
4.22	Zellfraktionierung von Src-Ezrin α h/ct-transfizierten Mausfibroblasten .	63
4.23	Fluoreszenz-Mikroskopie von verkürztem Ezrin	64
4.24	Ras-Aktivierungs-Assay mit Src-Ezrin α h/ct	64
4.25	Kurzzeit-Proliferations-Assay von Src-Ezrin α h/ct-transfizierten Mausfi- broblasten mit BrdU	65
5.1	Integrin-Rezeptoren Familie	69

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von ERM-Proteinen (Ezrin, Radixin, Moesin) in der Aktivierung von Ras. Ich zeige, dass siRNA abhängiges Blockieren von ERMs die von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) abhängige Ras-Aktivierung hemmt.

Durch Immunopräzipitation zeige ich, dass ERM-Proteine in einem Komplex mit RTK, SOS und Ras zu finden sind. Zur Interaktion von ERM-Proteinen mit RTKs ist ein Ko-Rezeptor nötig. Es war mir möglich, für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGF-Rezeptor, diesen Ko-Rezeptor als Integrin β -1 zu identifizieren und mit siRNA Versuchen gegen Integrin β -1 einen Verlust der Ras-Aktivierung zu zeigen.

Allerdings konnte ich den Ko-Rezeptor durch Einbringen einer Lipidmodifizierung in Ezrin ersetzen. So ließ sich nachweisen, dass die Verankerung von Ezrin in der Plasmamembran ausreicht, Ras unabhängig von RTs zu aktivieren.

Des weiteren konnte ich eine Punktmutation in Ezrin einbringen und nachweisen, dass die direkte Bindung von Ezrin an GDP-Ras ein essentieller Schritt in der Aktivierung des Signalwegs ist.

1.2 Abstract

This thesis deals with the role of ERM proteins (Ezrin, Radixin, Moesin) in the activation of Ras. I could show that the siRNA dependent block of ERMs repress the receptor-tyrosine-kinase (RTK) dependent Ras-activation.

I showed via immunoprecipitation that ERMs are in a complex together with RTK, SOS and Ras. For the interaction between ERM and RTK a co-receptor is required. I identified this co-receptor as Integrin β -1 and with siRNA experiments against Integrin β -1 I could show a loss of Ras activation.

I was able to replace this co-receptor with a lipidmodified Ezrin and I demonstrated a RTK independent activation of Ras.

I was also able to insert a pointmutation in Ezrin to show that Ezrin GDP-Ras binding is essential for the activation of the signaling pathway.

2 Einleitung

Die zelluläre Kommunikation, welche einerseits zwischen Zellen, aber andererseits auch zwischen Zellen und dem extrazellulären Umfeld stattfinden kann, wird im wesentlichen von Zell-Oberflächen-Proteinen geregelt. Diese wandeln die ankommenden Informationen in Signale um, die in die verschiedensten Zell-Kompartimente übermittelt werden. Einen Großteil dieser Signale verwenden Signalwege, welche durch Ras vermittelt werden [1, 2]. Eine zentrale, regulative Rolle spielt hierbei Nukleotid-gebundenes Ras, welches verschiedenste Auswirkungen auf die Zelle hat (Abb 2.1).

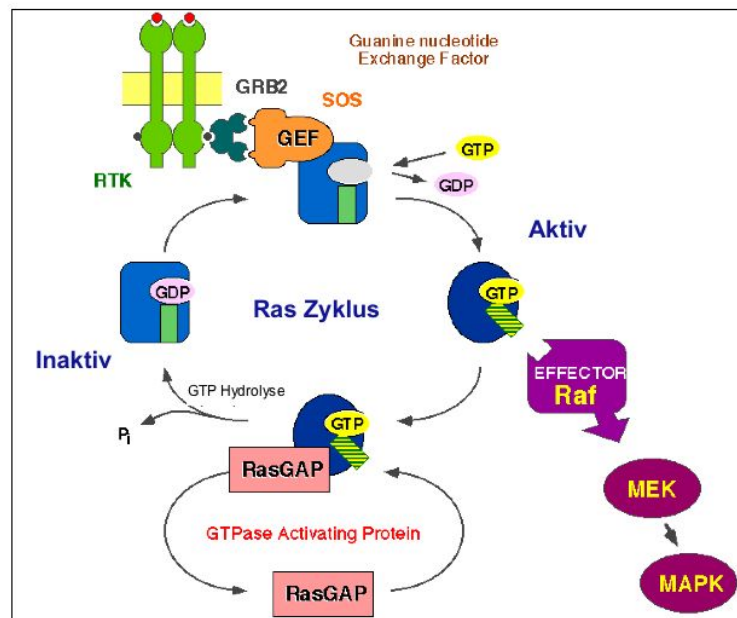


Abbildung 2.1: Die klassische Ras-Aktivierung. SOS (Son of Sevenless) dient als GEF (Guanine Exchange Factor) und führt damit zum Austausch von GDP hin zu GTP, was schließlich zur Proliferation der Zelle führt. GAPs (GTPase aktivierende Proteine) sind im wesentlichen an der Inaktivierung beteiligt.

2.1 Ras

Ras (rat sarcoma) wurde bereits 1979 als ein Onkogen entdeckt [3] und es konnte bald als das Schlüsselprotein identifiziert werden, welches nicht nur für die experimentelle Transformation von Zellen, sondern auch für die Tumorphagenese im Mensch verantwortlich war [4].

Das nur 21 kDa große Protein Ras gehört zu der Ras-Superfamilie, welche über 150 Mitglieder allein im Menschen besitzt. Ras-Proteine sind kleine monomere GTPasen (Guanosin-Tri-Phosphatasen), die weit verbreitet sind. Man kann orthologe Proteine in verschiedenen anderen Spezies wie Drosophila, C. elegans, Hefen und Pflanzen finden. Ras ist nicht nur in die Proliferation von Zellen involviert, sondern auch in die Differenzierung [5], die Morphologie [6], in die Apoptose [7] und in die Seneszenz [8].

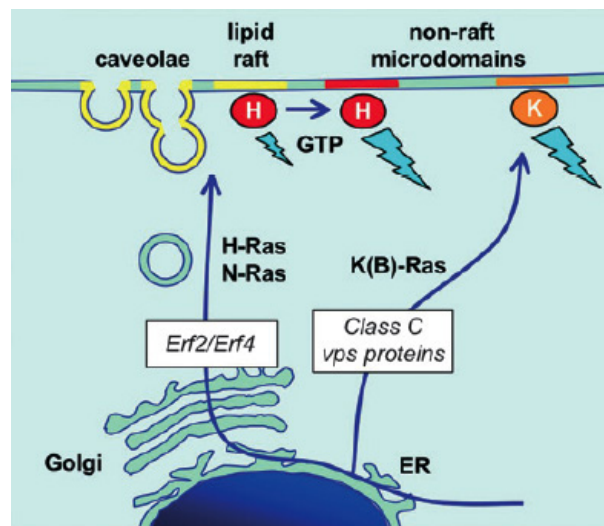


Abbildung 2.2: Die unterschiedliche Lokalisation der Ras-Isoformen (nach [9]). Ras besitzt vier unterschiedliche Isoformen, diese sind vermutlich in verschiedenen Mikrokompartmenten lokalisiert, wo sie unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können.

In Mammalia werden vier verschiedene Isoformen von drei unterschiedlichen Genen codiert. H-Ras (Harvey-Ras), K-Ras4A (Kirsten-Ras), K-Ras4B und N-Ras (Neurolastoma-Ras) sind zwar hoch konserviert, aber ihre Funktionen sind unterschiedlich [9] und es ist umstritten, ob die verschiedenen Isoformen in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Proteine rekrutieren und damit auch für die verschiedensten Signalwege verantwortlich sind (Abb 2.2). So lässt sich die Menge an GTP-gebundenem Ras beispielsweise in T-Lymphozyten durch die Stimulation mit Interleukin-2 erhöhen [10]. In Epithelzellen kann dies durch TGF- β geschehen [11] und in Fibroblasten lässt sich die Ras-GTP Menge unter Anderem durch Stimulation mit PDGF erhöhen [12, 13].

Auch die post-translationelle Modifikation ist unterschiedlich (Abb 2.3), allerdings sind alle Isoformen lipidmodifiziert, was die Lokalisation in der Plasmamembran er-

laubt. Alle Isoformen müssen zunächst in ihrem C-terminalen CAAX-Motiv (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Methionin oder Serin) in drei Schritten modifiziert werden [14]. Diese Modifikation beinhaltet neben der Farnesylierung des Cysteins des CAAX-Motivs, welche im Zytosol stattfindet [15], auch die AAX-Proteolyse [16] und schließlich die Methylierung des farnesylierten Cysteins, welche im endoplasmatischen Retikulum stattfindet [17]. Neben diesen Orten der Modifikation ist N-Ras aber auch in Mitochondrien zu finden [18] und Zellen welchen N-Ras fehlt zeigen eine abnormale mitochondriale Morphologie.

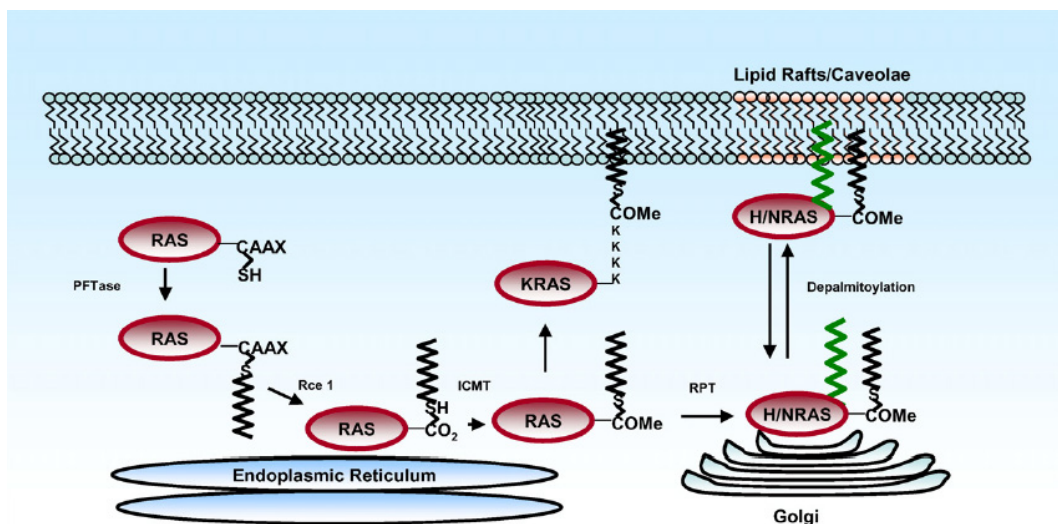


Abbildung 2.3: Die Lipidmodifikation der Ras-Isoformen (nach [19]). Die Ras-Isoformen werden auf unterschiedliche Art und Weise lipidmodifiziert.

Die verschiedenen Ras-Isoformen besitzen aber nicht alle die gleichen Lipidmodifikationen. So ist zwar bei allen Isoformen eine Farnesylierung am C-terminalen CAAX-Motiv zu finden, aber nur bei H-Ras, K-Ras4A und N-Ras findet zusätzlich auch eine Palmitoylierung statt [19]. Die Farnesylierung alleine würde nur eine schwache Bindung an die Plasmamembran gewährleisten, erst die zweite Modifikation führt zur korrekten Mikrolokalisierung [20], wo Ras schließlich seine Funktion wahrnehmen kann. Auch der Transportweg ist nicht allen Ras-Isoformen gemeinsam. So wurde gezeigt, dass H-Ras und N-Ras vorwiegend konventionell sekretorisch über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert werden, K-Ras4B dagegen wandert über einen Golgi-unabhängigen, bisher aber noch nicht charakterisierten Weg an die Plasmamembran [21, 22].

Einer der am meist untersuchten Signalwege ist der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg (MAP-Kinase Signal-Kaskade), welcher die Proliferation, die Differenzierung und auch die Seneszenz reguliert.

2.1.1 Ras in der MAP-Kinase Signal-Kaskade

MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierete Protein-Kinasen) Signal-Kaskaden sind sowohl in der Regulation der Proliferation, im Überleben und in der Differenzierung der Zelle beteiligt

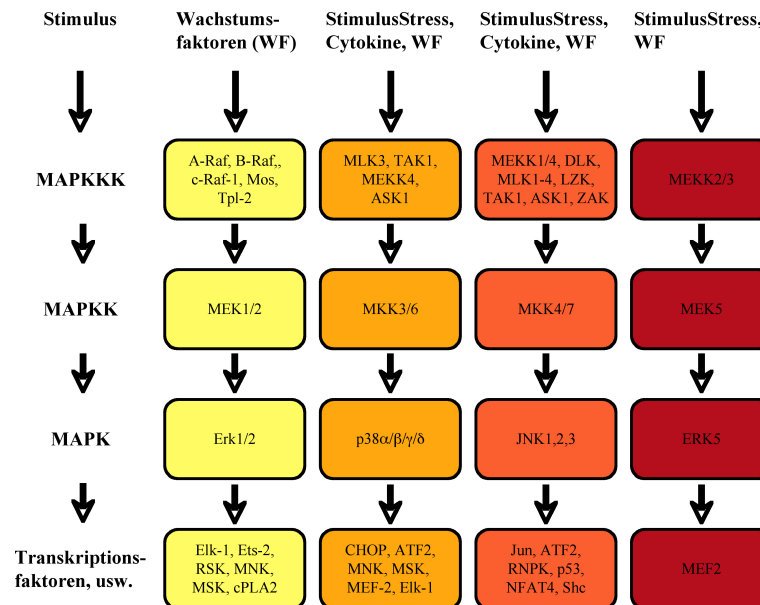


Abbildung 2.4: Verschiedene MAP-Kaskaden (nach [23]). In Mammalia existieren vier verschiedene MAPK-Kaskaden. In der zweiten Spalte (gelb) ist der Signalweg dargestellt, welcher durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird und über Raf, MEK und Erk schließlich zur Proliferation führt.

Erfolgt eine Stimulierung der Signalkaskade durch Wachstumsfaktoren (Abb 2.4) welche an RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) binden, so wird in der Folge davon Ras aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt über den Austausch von GDP durch GTP. Um diesen Austausch der Nukleotide zu erreichen, muss in Ras eine Konformationsänderung stattfinden, aufgrund dessen GDP (Guanosin-5'-Di-Phosphat) durch GTP (Guanosin-5'-Tri-Phosphat) ersetzt wird.

Reguliert wird dieser Austausch in diesem Fall durch SOS1 (Son of Sevenless), einem Ras-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor, siehe Abb 2.1), welches die GTP-Bindung an Ras fördert. Dies geschieht dadurch, dass SOS mit einer spezifischen helikalen Struktur mit Ras interagiert. Die in Ras beteiligten Regionen werden als switch 1 und switch 2 bezeichnet und haben verschiedenen Konformationen, je nach dem ob der inaktive oder der aktive Zustand vorliegt [24, 25]. SOS bindet direkt an die switch 2 Region und blockiert damit den Eintritt des Phosphatrestes des Nukleotids an diese Bindestelle und blockiert zusätzlich das Mg^{2+} -Ion, welches für eine feste Bindung benötigt wird. Zur selben Zeit wird in SOS die helikale Haarnadelstruktur benötigt, um die switch 1 Region zur Seite zu schieben. Somit ist der Basen-bindende Teil der Nukleotid-Bindestelle komplett offen [26]. Erst wenn dies alles geschehen ist, kann GTP an Ras

binden.

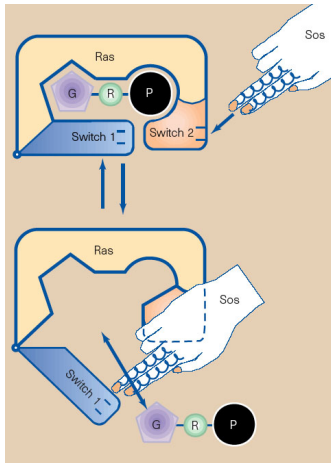


Abbildung 2.5: Der molekulare Schalter in Ras (nach [25]). Um mit GTP beladen zu werden, muss in Ras ein molekularer Schalter umgelegt werden. Die daran beteiligten Regionen in Ras werden als switch 1 und switch 2 bezeichnet. Im wesentlichen ist SOS am betätigen dieses Schalters beteiligt. "G" (Guanin), "R" (Ribose) und "P" (Phosphat) bezeichnen hier die einzelnen Komponenten des Nukleotids.

Nachdem Ras seinen aktiven GTP-gebundenen Status erreicht hat, kann es an Effektor-Proteine wie beispielsweise PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase) oder – im Falle des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs – an Raf-Proteine binden. In Mammalia sind drei verschiedenen Raf-Proteine vorhanden: Raf-1, A-Raf und B-Raf. Alle drei Raf-Proteine können zwar mit Ras interagieren, allerdings haben sie in der Folge des Signalweg nur MEK als gemeinsames Substrat [27, 28]. Raf-Proteine liegen normalerweise inaktiv im Zytosol vor, werden dann aber durch Aktivierung an der Zellmembran lokalisiert [29, 30].

Im inaktiven Zustand von Raf wirkt der N-terminale Teil als Autoinhibitor der C-terminalen Kinase-Domäne. Dies geschieht dadurch, dass ein weiteres Protein – 14-3-3 – sowohl an N-terminale als auch an C-terminale Phosphorylierungsstellen bindet und dadurch diesen Zustand noch verstärkt. Werden nun Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch Wachstumsfaktoren stimuliert, kommt es zur Aktivierung, das heißt zur GTP-Beladung, von Ras. Dadurch gelangt das bis dahin inaktive Raf an die Membran und das Inhibitor-Protein 14-3-3 löst sich von Raf. Dadurch kann nun auch Raf aktiviert werden und die Signalkaskade wird in Gang gesetzt. Über MAP-Kinasen werden schließlich Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche in der Folge die Proliferation aktivieren.

Es ist zwingend notwendig, dass die Beladung von Ras kontrolliert wird, da in der Zelle ein ungefähr zehnfacher Überschuss an GTP vorliegt und dadurch ein nichtreguliertes System ständig aktiv bleiben würde. Daher ist sowohl die Aktivierung, als auch die Inaktivierung von Ras spezifisch geregelt. Die Inaktivierung erfolgt durch die Spaltung von GTP. Ras besitzt zwar eine eigene intrinsische GTPase Aktivität, welche diese Inaktivierung zur Folge hat, aber GAPs (GTPase aktivierende Proteine, siehe Abb 2.1) sind ebenfalls an der Inaktivierung beteiligt, indem sie die Hydrolysegeschwindigkeit des Ras-gebundenen GTP erhöhen.

2.2 SOS

Das Protein SOS wurde ursprünglich als Homolog zu Cdc25 (Cell division cycle) identifiziert [31, 32], welches als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für Ras in Hefen bekannt war. Eine andere Forschungs-Gruppe konnte SOS als eine Mutation nachweisen, welches den Verlust der Sevenless-Aktivität in *Drosophila* kompensieren konnte [33]. Da SOS im Signalweg unterhalb der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Sevenless liegt, wurde das Protein als Son of Sevenless bezeichnet. Die Tatsache, dass SOS zudem oberhalb von Ras aktiv war, führte dazu, dass SOS als Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF) für Ras identifiziert werden konnte [34]. In Mammalia konnten zwei verschiedene Homologe nachgewiesen werden – SOS1 und SOS2.

Das SOS1-Protein hat ein Molekulargewicht von ungefähr 152 kDa und besitzt verschiedene Domänen (Abb 2.6). Im N-terminalen Bereich sind eine DH- (Dbl Homologie) und eine PH-Domäne (Pleckstrin Homologie) zu finden, welche durch die positive Ladung mit der Plasmamembran interagieren können [35, 36]. Anschließend folgt eine REM- (Ras exchanger motif) und eine Cdc25-Domäne [37, 38]. In der daran anschließenden Prolin-reichen Domäne liegt die SH3-Domäne, welche für die Bindung an das Adaptor-Protein Grb 2 benötigt wird.



Abbildung 2.6: Teil der Proteinstruktur von SOS (nach [38]). Nach der N-terminalen DH/PH-Domäne folgt eine REM-Domäne, welche zusammen mit der Cdc25-Domäne für die Ras-spezifische GEF-Aktivität verantwortlich ist. Die Cdc25-Domäne trägt die helikale Haarnadelstruktur (HH). Anschließend folgt eine Prolin-reiche Struktur (PXXP), in der auch die SH3-Domäne liegt, welche für die Bindung an Grb 2 verantwortlich ist.

Als GEF spielt SOS eine wichtige Rolle in der Zellkommunikation und in der Signaltransduktion. Da das Protein verschiedene GEF-Domänen besitzt, kann sowohl Rac, als auch Ras als Partner dienen – abhängig von der jeweiligen Domäne.

Im Falle der Ras-spezifischen GEF-Aktivität werden die REM-Domäne und die Cdc25-Domäne benötigt [39, 40]. Um als GEF aktiviert zu werden, muss in SOS eine allosterische Aktivierung erfolgen. Diese wird durch eine zweite – zusätzlich zu der katalytischen – Ras-Bindestelle gewährleistet. Dieses allosterisch gebundene Ras verbindet die REM-Domäne mit der Cdc25-Domäne [38] und kann sowohl GTP- als auch GDP-Ras binden [41]. Nun kann eine Bindung zwischen SOS und Ras und anschließend ein Austausch von GDP gegen GTP erfolgen. Hier sind in SOS die helikale Haarnadelstruktur und in Ras die switch-Regionen beteiligt (Abb 2.5). Durch die allosterische Ras-Bindung wird die Bindungs-Affinität von Ras an die katalytische Bindestelle an SOS erhöht [42], allerdings konnten die strukturellen Hintergründe dafür noch nicht geklärt werden (Abb 2.7).

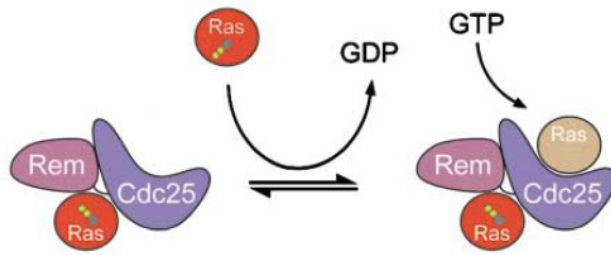


Abbildung 2.7: Die schematische Aktivierung von SOS (nach [42]). Gezeigt ist eine Möglichkeit der SOS-Ras-Interaktion. GDP-beladenes Ras kann zwischen der REM-Domäne und der Cdc25-Domäne binden. Dies erlaubt den Austausch von GDP durch GTP an einem weiteren Ras-Protein, welches an der Cdc25-Domäne gebunden ist.

Um aber überhaupt erst in die Signalkaskade involviert zu werden und seine Funktion als GEF wahrzunehmen, muss SOS mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) interagieren. Dazu wird das Protein Grb 2 (Growth factor receptor-bound protein 2) benötigt. Das Adaptor-Protein Grb 2 hat eine Bindedomäne für das Protein SOS und beide Proteine liegen schon vor der Rezeptor-Stimulation assoziiert im Zytoplasma vor [43]. Diese Assoziation erfolgt über eine SH3-Domäne (Src homology 3) in Grb 2 und einer Prolinreichen Region nahe des C-Terminus in SOS [44, 45].

Zusätzlich trägt Grb 2 eine SH2-Bindedomäne (Src homology 2) oder PTB-Domänen (Phosphotyrosin-Bindedomänen) und kann spezifisch an phosphorylierte Tyrosine der RTKs binden.

2.3 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind membranständige Zelloberflächenproteine. Sie besitzen N-terminal eine extrazelluläre Liganden-Bindedomäne und C-terminal eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne [46, 47]. Im Mensch sind 58 transmembrane Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bekannt, welche sich in 20 Unterfamilien unterteilen [48, 49].

Allen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist gemeinsam, dass sie den Transfer von γ -Phosphat, welches von ATP stammt, zu Hydroxyl-Gruppen der Tyrosine an den jeweiligen Zielproteinen katalysieren [50]. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen haben eine wichtige Kontrollfunktion in der Zelle. Sie regulieren beispielsweise die Zellteilung, die Zelldifferenzierung, aber auch den Zellzyklus [46].

Die Signaltransduktion über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen benötigt eine Liganden induzierte Dimerisierung. Dadurch erfolgt schließlich die Autophosphorylierung an Tyrosinen im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren [51]. An den phosphorylierten Tyrosinen können nun Adapterproteine, welche eine SH2-Domäne tragen, binden (Abb 2.9).

Es scheint aber, dass diese Dimerisierung nicht genug für die Kinase-Aktivität des Rezeptors wäre. So wird beispielsweise durch die Bindung von Liganden eine Konformationsänderung induziert, die die Autophosphorylierung unterstützt [46, 52].

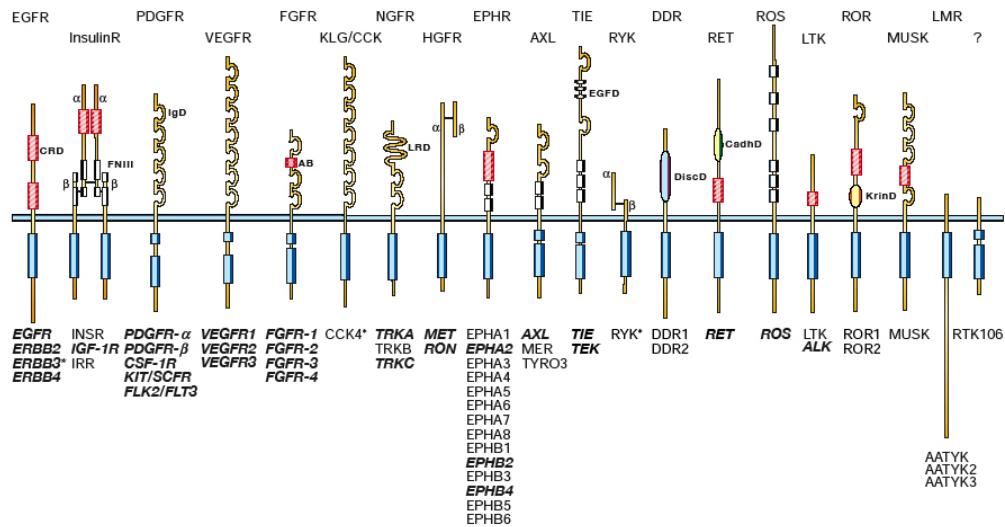


Abbildung 2.8: Übersicht RTKs. Die Übersicht zeigt die verschiedenen Familien der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen.

2.4 Ko-Rezeptoren

In der Aktivierung Wachstumsfaktor-stimulierter Signalwege, spielen Ko-Rezeptoren eine wichtige Rolle, da Wachstumsfaktoren nicht nur an die eigentlichen Rezeptoren binden, sondern eben auch an Ko-Rezeptoren. Diese Bindung zwischen Wachstumsfaktoren und Ko-Rezeptor erfolgt allerdings mit einer weitaus niedrigeren Affinität, als die Bindung zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Trotz allem haben aber diese Wachstumsfaktor-Ko-Rezeptor Bindungen die Fähigkeit, den Wachstumsfaktor oder aber den Rezeptor so zu verändern, das dies zu einer biologischen Antwort führt [53, 54, 55, 56].

So konnte am Beispiel von FGF (Fibroblast Growth Factor) gezeigt werden, dass Heparin (beziehungsweise Heparan-Sulfat) als Ko-Rezeptor für die Liganden-induzierte Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase FGF-Rezeptor notwendig ist [57]. Mittlerweile konnte ein dreifach-Komplex aus FGF, FGF-Rezeptor und Heparan-Sulfat nachgewiesen werden, welcher sich auf der Zelloberfläche bildet [58]. Welche Rolle der Ko-Rezeptor hier spielt, konnte mittels Kristallographie gezeigt werden. Heparin hat demnach die Fähigkeit, die Stabilität des FGF-FGF-Rezeptor-Komplexes durch Quervernetzung Beider zu erhöhen [55, 56, 59, 60, 61]. Dies ist aber nicht der einzige Wirkungsmechanismus. Ko-Rezeptoren haben auch die Fähigkeit, die Liganden-Konzentration zu erhöhen und diese zu präsentieren [62, 63, 64].

Ein weiterer wichtiger Ko-Rezeptor ist beispielsweise CD44.

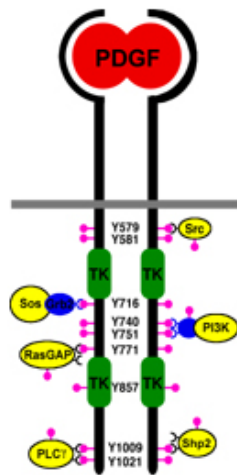


Abbildung 2.9: RTK am Beispiel des PDGF-Rezeptors. Durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren dimerisieren RTK und es erfolgt eine Autophosphorylierung im zytoplasmatischen Teil an Tyrosinen.

2.4.1 CD44

CD44 ist ein Typ I Transmembran-Glycoprotein (Abb 2.10) und ist als der hauptsächliche Hyaluronsäure-Rezeptor weit verbreitet. CD44 war zudem der zuerst identifizierte Hyaluronsäure-Rezeptor und man konnte zeigen, dass die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und CD44 unter anderem sowohl die Zell-Adhäsion, als auch die Zell-Migration beeinflusst.

Das CD44-Gen hat 20 Exons, welche durch alternatives Spleißen zu den verschiedensten Spleißvarianten führen kann, wobei die meist verbreitete Form die Standard-Variante CD44s ist.

Es ließ sich ebenfalls nachweisen, dass CD44 vorwiegend in den Mikrovilli – kleine Zotten, die zur Oberflächenvergrößerung der Zelle dienen – und außerdem in Aktin-Polymerisations-Regionen (membrane ruffles) lokalisiert ist. Da CD44 allerdings keine Bindestellen für Aktin besitzt, liegt es nahe, dass eine indirekte Bindung über Proteine vorliegen muss, die über solche Bindestellen verfügen. ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin) verfügen über solche Bindestellen und sind ebenfalls mit dem Zytoskelett assoziiert und es konnte nachgewiesen werden, dass ERM-Proteine mit CD44 interagieren [65, 66].

Das CD44-Protein unterteilt sich in vier wesentliche Untereinheiten: den N-terminalen Teil und die anschließende Stamm-Region, welche extrazellulär zu finden sind, den transmembranen Teil und den C-terminalen, zytoplasmatischen Teil.

2.4.1.1 Der CD44 N-terminale Teil und die Stamm-Region

Der N-terminale Teil von CD44 ist der Teil, welcher zur Hyaluronsäure-Bindung dient. Er liegt extrazellulär und wird von den ersten fünf Exons kodiert. Man konnte nachwei-

sen, dass diese Domäne zumindest *in vitro* nicht nur an Hyaluron binden kann, sondern an wesentlich mehr Komponenten der ECM (Extracellulären Matrix). Beispielsweise an Kollagen, Laminin oder auch an Fibronectin [67, 68].

Die Größe der anschließenden Stamm-Struktur, die ebenfalls im extrazellulären Bereich liegt, ist variabel und hängt von der vorliegenden Spleißvariante ab. Was allerdings allen Spleißvarianten gemeinsam ist, ist eine 46 Aminosäuren kurze Sequenz, die die Stamm-Sequenz von der Plasmamembran trennt [69].

CD44 in seiner Spleißvariante v6 fungiert als Ko-Rezeptor für die RTKs Met, Ron und Trk, welche für Migration, Invasion, Morphogenese und für die Differenzierung von Zellen verantwortlich sind [70, 69]. CD44v6 ist notwendig, um einen Komplex aus Met, dem dazugehörigen Wachstumsfaktor HGF/SF (hepatocyte growth factor/scattered factor) und aus CD44 zu bilden. Dieser Komplex ist die Voraussetzung, um die Autophosphorylierung von Met zu induzieren [70].

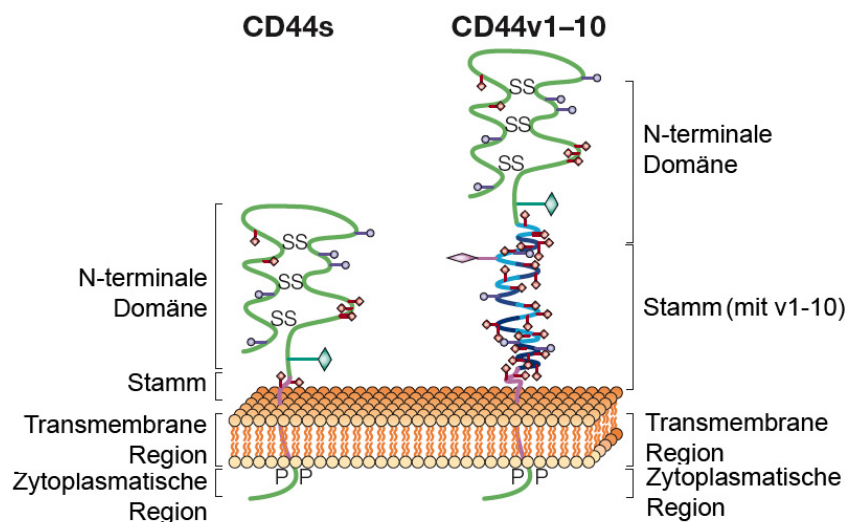


Abbildung 2.10: Das Transmembranprotein CD44 (nach [69]). CD44 besteht aus verschiedenen Domänen. Der N-Terminus mit der Stamm-Struktur ist spezifisch in Bezug auf RTKs und wirkt als Ko-Rezeptor. Der C-Terminus besitzt Bindestellen für ERM-Proteine

2.4.1.2 Der CD44 C-terminale Teil

Die C-terminale Region beginnt mit dem transmembranen Teil von CD44. Diese kurze Sequenz umfasst nur 23 Aminosäuren.

Unterhalb der Transmembrandomäne befindet sich eine Bindestelle für ERMs [71, 72]. Diese Sequenz ähnelt den Sequenzen anderer Transmembranproteine, die mit ERMs interagieren.

Das CD44-Protein ist an Position Serin 325 konstitutiv phosphoryliert. Diese Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert auch die Interaktion mit ERM-Proteinen

[72, 73]. Erfolgt ein Wechsel der Phosphorylierung durch Protein Kinase C (PKC) von Serin 325 hin zu Serin 291, dann resultiert daraus eine Dissoziation der ERMs.

Die Bindung des zytoplasmatischen Teils von CD44v6 an ERMs ist an der Kontrolle des HGF/SF-induzierten Signalwegs über Met beteiligt und ermöglicht den Signaltransfer im Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg [74]. Allerdings ist die Signalübertragung via HGF/SF nicht spezifisch in Bezug auf die Ras-Aktivierung. So konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Ras auch durch den Wachstumsfaktor PDGF erfolgen kann [75], diese Aktivierung aber ebenfalls ERMs benötigt.

2.5 Ezrin

2.5.1 Das Ezrin-Gen

Die Sequenz der cDNA wurde bereits 1989 beschrieben [76, 77]. Eine genauere Bestimmung der Lokalisation des Gens erfolgte allerdings erst später. Das menschliche Ezrin-Gen befindet sich auf Chromosom 6 in den Regionen q25.2 – q26 [78]. Das menschliche Ezrin-Gen besteht aus 13 Exons, welche sich auf einer Spanne von ungefähr 24 kb genomischer DNA befinden. Die Größe der Exons reicht von 12 bp bis hin zu 275 bp. Die Introns variieren von 182 bp bis zu einer Größe von 7 kb [79].

Nachdem auch die Sequenz von Radixin und Moesin – zwei weitere Mitglieder der selben Familie – bestimmt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Exons und Introns zwischen den Familienmitgliedern der ERM-Familie [80] hoch konserviert ist.

2.5.2 ERM-Proteine

Ezrin gehört zusammen mit Radixin und Moesin (ERM-Proteine) zu der Familie der Band 4.1 Proteine.. Ezrin, Radixin und Moesin wurden ursprünglich in verschiedenen Zelltypen entdeckt, aber alle ERM-Proteine sind membranassoziiert und in vielen verschiedenen Zelltypen zu finden

Ezrin wurde ursprünglich als ein Proteine identifiziert, welches zusammen mit dem Aktin-Zytoskelett an der Zelloberfläche lokalisiert war. Hier sind insbesondere Oberflächenstrukturen wie Mikrovilli zu nennen, aber es ist auch in so genannten "membrane ruffles" zu finden [81, 82]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es als Substrat spezifischer Protein-Tyrosin-Kinasen [83] dient. In polarisierten Epithelzellen lässt sich Ezrin vermehrt in den apikalen Mikrovilli nachweisen [84].

Radixin findet sich in adhärenen Kontaktstellen (adherens junctions). Diese Strukturen an der Zelloberfläche stellen Zell-Zell-Kontakte beziehungsweise Zell-ECM-Kontakte her [85]. Moesin wurde zunächst als ein Protein nachgewiesen, welches Heparin binden

kann [85, 86].

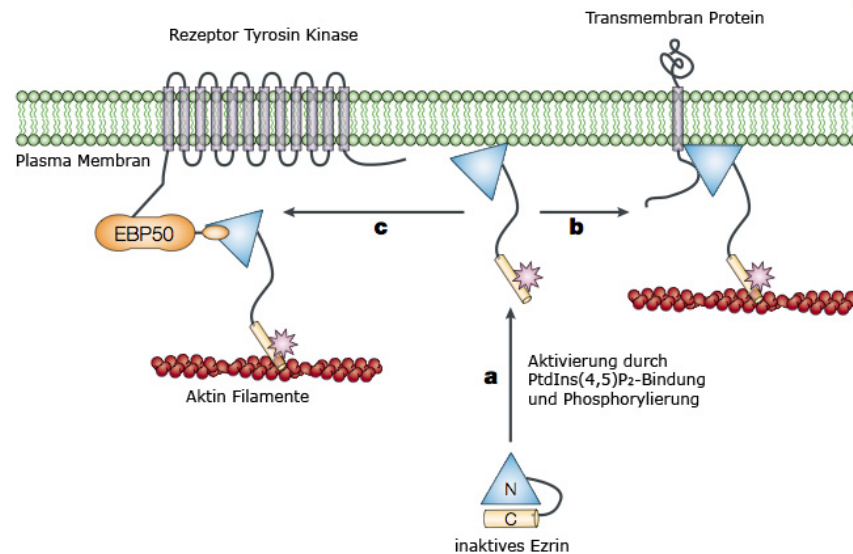


Abbildung 2.11: Ezrin Funktion im Ras Signalweg (nach [87]). Ezrin kann in der Zelle verschiedene Aufgaben wahrnehmen. Einerseits haben ERM-Proteine die Fähigkeit mit sich selbst zu interagieren, andererseits aber auch mit verschiedenen anderen Proteinen, bspw. mit Aktin, mit Transmembranproteinen oder auch mit Molekülen, die für den Aufbau des Zellgerüsts notwendig sind wie EBP50.

2.5.3 Die Struktur der ERM-Proteine

Alle ERM-Proteine haben eine vergleichbare Struktur. N-terminal liegt die konservierte FERM-Domäne (four-point-one/ERM), danach folgt eine α -helikale Domäne und im C-terminalen Bereich ist die Aktin-Binde-Domäne zu finden. Der N-terminale Teil der ERM-Proteine ist der Teil, welcher mit der Zellmembran assoziiert ist [76], während der C-terminale Teil eine Verbindung zum Zytoskelett herstellt [88].

Außer in der N-terminalen FERM-Domäne gibt es keine signifikante Identität mit Band 4.1 Proteinen, allerdings zeigen die ERM-Proteine dagegen untereinander eine sehr hohe Übereinstimmung in ihrer Sequenz (Abb 2.12). Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit konnte gezeigt werden, dass in Radixin-, bzw. Moesin-defizienten Mäusen eine Kompensation der Aufgaben durch die anderen Mitglieder der ERM-Familie übernommen werden kann [89]. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass in Säugergewebe ERM-Proteine eigene Expressionsmuster haben und daher vermutlich auch ganz eigene Funktionen haben.

Wird, wie in Ezrin^{-/-} Mäusen, kein Ezrin exprimiert, sterben diese Mäuse bald nach der Geburt. In Darm-Epithelzellen ist Ezrin das einzige ERM-Protein und spielt eine

wichtige Rolle bei der Ausbildung der Darmzotten, welche in Ezrin-defizienten Mäusen abnormal ausgebildet sind [90].

In Radixin-defizienten Mäuse konnte gezeigt werden, dass in den tubulären Strukturen, welche Leberzellen miteinander verbinden, Veränderungen auftreten. In diesen Zellen fehlt das Proteine MRP 2 (multidrug resistance protein 2), was vermuten lässt, dass Radixin für die Lokalisierung/Verankerung dieses Proteins verantwortlich ist [89].

Fehlt Dmoesin – das einzige ERM Protein – in Drosophila, konnte gezeigt werden, dass die Polarität der Oocyten dadurch zerstört wird, dass die Verankerung von F-Aktin im Kortex nicht stattfinden kann [91, 92]

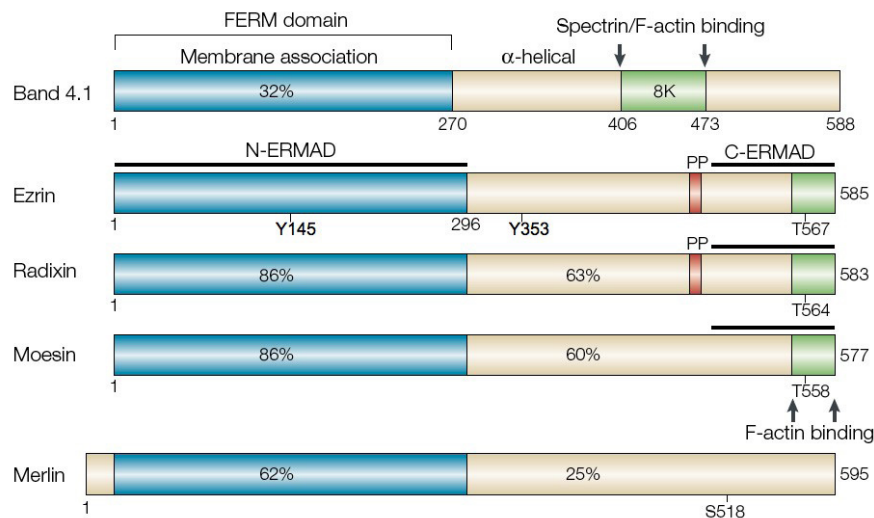


Abbildung 2.12: Band 4.1 Proteine im Vergleich (nach [87]). Strukturell gehören ERM-Proteine zu den Band 4.1 Proteinen. Allerdings unterscheiden sie sich signifikant in ihrer Sequenz.

Mittlerweile konnte die Struktur der FERM-Domäne von Radixin [93], von Moesin [94] und von Ezrin [95] ermittelt werden und es zeigte sich ein einheitliches Bild. Die FERM-Domäne ist 3-flügeliges Gebilde aus 3 verschiedenen Untereinheiten (Abb 2.13). Subdomäne A besteht aus den Aminosäuren 2–82 und einer anschließenden Verbindungssequenz (Linker) aus 13 Aminosäuren zur Subdomäne B. Die Faltung der ersten Subdomäne zeigt eine typische Ubiquitin-Faltung [96], welche auch eine Ras-Bindedomäne von Raf-1 enthält [97]. Subdomäne B besteht aus den Aminosäuren 96–195 mit anschließenden 8 Aminosäuren, die sie mit der Subdomäne C verbindet. Die Struktur ist klassifiziert als eine Co-A-Bindeprotein Bindestelle [98]. Zusätzlich findet sich an Position Tyrosin 146 eine Phosphorylierungsstelle. Subdomäne C besteht aus den Aminosäuren 204–297. Die Struktur zeigt eine typische Pleckstrin Homologie (PH) Domäne welche an PIP_2 binden kann [88]. Eine solche Domäne findet man unter anderem auch in Dynamin, SOS oder Shc [99, 100, 101].

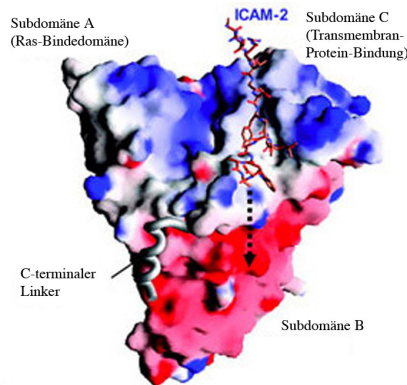


Abbildung 2.13: Der strukturelle Aufbau der FERM-Domäne in ERM-Proteinen (nach [102]). In Subdomäne A liegt eine mögliche Ras-Bindedomäne.

2.5.4 Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung

Ezrin liegt in zwei verschiedenen Konformationen vor. Ist das Protein nicht phosphoryliert, dann besitzt Ezrin eine inaktive geschlossene Form. Im aktivierten Zustand, welcher mit der Phosphorylierung einhergeht, erfolgt eine Konformationsänderung hin zur offenen Form. Jetzt wird eine Bindung an das Aktin-Zytoskelett möglich, ohne dass die Signalkaskade nicht beginnen kann. Der α -helikale, mittlere Teil und die N-terminale Aktin-Binde-Domäne haben dabei entscheidenden Einfluss, da sie in der nicht-phosphorylierten Form die Subdomäne A und B maskieren. Für Moesin konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne den Verbindungsteil zwischen Subdomäne A und B maskieren kann [94]. Ebenfalls in Moesin wurde gezeigt, dass auch der α -helikale Teil die FERM-Domäne partiell maskiert [103].

Um aktiviert zu werden, müssen ERM-Proteine phosphoryliert werden [104]. Der inaktive Zustand ist charakterisiert als ein Zustand, in dem die N-terminale FERM-Domäne mit dem C-terminalen Teil assoziiert ist [105, 106]. Dieser Zustand liegt beispielsweise in nicht-proliferierenden Zellen vor [95]. Für diesen Zustand sind bisher keine Bindungspartner bekannt, außer möglicherweise eine regulatorische Untereinheit der Protein-Kinase A [107].

Für die Phosphorylierung von Ezrin kommen verschiedene Kandidaten in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest 3 verschiedene Kinasen Threonin an Position 567 phosphorylieren können - Rho-Kinase [108, 109], Protein Kinase C α [110] und Protein Kinase θ [111, 112]. Allerdings konnten auch andere Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden, beispielsweise für Tyrosin 145 und für Tyrosin 353 [113, 114, 115].

Liegt der aktive Zustand vor, dann können ERMs an verschiedene Partner binden, welche als Transmembranproteine in der Plasmamembran verankert sind. Beispielsweise ist eine Bindung an CD44 möglich [65, 116], an CD43 [71, 117] oder an ICAM-1 [118], ICAM-2 [119, 118, 102] und ICAM-3 [116]. Für das Transmembranprotein Integrin β -

1 konnte zwar bisher noch keine Bindung an ERMs nachgewiesen werden. Allerdings konnte anhand von Integrin α -3 β -1-abhängiger Migration eine Ko-Faktor-Funktion für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGFR gezeigt werden [120].

2.6 Ziel der Arbeit

Ezrin spielt in der Wachstumsfaktor-vermittelten Aktivierung von Ras eine entscheidende Rolle. Nur wenn Ezrin an den zytoplasmatischen Teil von Ko-Rezeptoren (Transmembranproteinen) wie beispielsweise CD44 bindet, ist ein Signaltransfer zum Ras/MAP-Kinase-Signalweg gewährleistet. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ezrin an CD44v6 für die HGF-induzierte Aktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs benötigt wird [74] und die Bildung dieser Komplexe mit der Ras-Aktivierung korrelieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach PDGF-Stimulation ERMs zusammen mit Ras und SOS in diesen Komplexen zu finden sind [75].

Bis jetzt ist noch nicht klar, in welcher Weise genau Ezrin in diesen Signaltransfer eingreift. Ziel dieser Arbeit war es daher, Komplexe nachzuweisen, in welchen Ezrin zu finden ist. Im Folgenden sollten diese Komplexe untersucht werden und anhand Ergebnisse sollte analysiert werden, wie Ezrin in diese Komplexe eingebunden ist.

Des weiteren war unklar, welche Rolle Ko-Rezeptoren in der Aktivierung des Signalwegs spielen. Um den Signalweg zu aktivieren wird die Lokalisation von Ezrin an der Plasmamembran benötigt. Dies geschieht dadurch, dass Ezrin an Ko-Rezeptoren (Transmembranproteine) bindet. Neben CD44v6 als Ko-Rezeptor der HGF-induzierten Aktivierung konnte Integrin β -1 als Ko-Rezeptor für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGFR identifiziert werden [120] und es konnte gezeigt werden, dass Integrin β -1 in einem Komplex zu finden ist, der sich bei der PDGF-induzierten Ras-Aktivierung bildet (Helen Morrison, nicht veröffentlicht). Hier stellte sich die Frage, ob Integrin β -1 tatsächlich als Ko-Rezeptor für den PDGF-Rezeptor bestätigt werden kann.

Die Entdeckung der Ko-Rezeptoren lässt vermuten, dass eine Aufgabe von Ko-Rezeptoren ist, Ezrin an den jeweils benötigten Ort zu lenken. Wäre dies der Fall, so stellt sich die Frage, ob eine Bindung an Ko-Rezeptoren überhaupt zwingend notwendig für die Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs ist. Daraus entstand die Idee, Ezrin direkt an die Membran zu bringen und zu fragen ob die Möglichkeit eines Ko-Rezeptoren unabhängigen Signaltransfers bestünde.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die folgenden Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Reinheitsstufe verwendet. Das Wasser für wässrige Lösungen wurde über ein Milli-Q-Reinstwassersystem der Firma Millipore entsalzt und in sterilen Gefäßen autoklaviert.

Acrylamid/N,N'-Methylbisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
ATP*	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BrdU*	Oncogene, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA*	Roth, Karlsruhe
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Coelenterazin	Sigma-Aldrich
Complete Mini Protease Inhibitor EDTA-frei	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt
DCS*	PAA, Österreich
Deoxycholate	Roth, Karlsruhe
DMSO*	Roth, Karlsruhe
dNTP* Mix	Promega, USA
DTT*	Roth, Karlsruhe
EDTA*-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
EGTA*	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FBS*	PAA, Österreich
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe

G 418*	Roth, Karlsruhe
GDP*-Natriumsalz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycyl-Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GST*-Agarose	Upstate, USA
GST*-Ras Agarose	Upstate, USA
GTP*-Tetralithiumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES*	Roth, Karlsruhe
IPTG*	Novagen, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Mangan-II-Chlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS*	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadat	Roth, Karlsruhe
PBS*	PAA, Österreich
PDGF* A/A	Roche, Mannheim
PIPES*	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
(Ortho-)Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Roth, Karlsruhe
Protein A/G-Plus Agarose	Oncogene, USA
Puromycin	Roth, Karlsruhe

Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS*	Roth, Karlsruhe
Sepahrose 4B	Amersham, Schweden
Thrombin	Amersham, Schweden
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Trypsin	PAA, Österreich
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

* siehe Anhang A.1 Allgemeine Abkürzungen

Alle übrigen Chemikalien, wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bakterien-Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Blaukappenröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Branson Sonifier	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier Whatman GB03	Schleicher & Schüll, Dassel
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Fluoreszenzfilter	Zeiss, Jena
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kühlzentrifuge	Beckmann, Stuttgart
Mithras Lumineszenzdetektor.....	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Netzgeräte für Elektrophoreseapparaturen	BioRad, München
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
PCR-Maschine.....	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter	Knick, Berlin
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Rotationsmischer	neoLab, Heidelberg
Sterilbank	Glatt AG, CH
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Bender & Hohbein, Karlsruhe
Zellkulturartikel	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.3 Bakterien und eukaryotische Zellen

NIH3T3: Mausfibroblasten

RT4-D6P2T: Ratten-Schwannomazellen

DH5 α : Escherichia coli

3.1.4 Plasmide

Alle verwendeten Ezrin-Konstrukte wurden entweder in pcDNA 3.1 oder puHD 10.3 verwendet. Für die Selektion positiver Klone nach stabiler Transfektion wurde pBABEpu-ro verwendet. Für die induzierbare Ezrin-Expression wurde ein Tet-On-Vektor (pUHG 17.1) verwendet.

Für die Reporterassays wurden für die Expression des Elk-Gal-Fusionsproteins das Plasmid pSG-Gal4-Elk1 in die Zellen eingebracht, für die Expression des Gal-Luc-Fusionsproteins wurde das Plasmid pG5E4 verwendet.

3.1.5 DNA-Konstrukte

Die Ezrin-Konstrukte trugen je nach Verwendungszweck entweder eine myc- oder eine VSV-g-Erkennungssequenz. Außer den unveränderten Ezrin-Konstrukten, wurden auch Konstrukte verwendet, welche ein Myristoylierungsmotiv (Src-Motiv) besaßen, beziehungsweise um den N-Terminus verkürzt waren (α -helikal/C-terminales Ezrin).

myc-Sequenz	ATT CAT GTT CAG GTC CTC
VSV-G-Sequenz	TAT ACG GAC ATA GAA ATG AAT AGG CTA GGC AAG
Src-Motiv	GGT TCA TCA AAA TCA AAA CCT AAG

Neben den Wildtyp Formen wurden auch mutierte Formen von Ezrin verwendet, in die die Punktmutationen R40L eingebracht wurde.

3.1.6 Oligonukleotide

3.1.6.1 DNA

Alle DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Operon bezogen.

fw: vorwärts Sequenz (forward); **rev:** rückwärts Sequenz (reverse)

Ezrin R40L fw	ACT ATC GGC CTC CTG GAA GTG TGG TAC
Ezrin R40L rev	GTA CCA CAC TTC CAG GAG GCC GAT AGT

3.1.6.2 siRNA

Die Integrin β -1 siRNA-Duplexe wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Die Ezrin, Radixin und Moesin siRNA-Duplexe von der Firma Ambion.

fw: vorwärts Sequenz (5' – 3'; forward)

rev: rückwärts Sequenz (3' – 5'; reverse)

siITG β -1 fw, duplex 1 (Maus)	GAA CGG AUU UAG UGA AUG AUU
siITG β -1 rev, duplex 1 (Maus)	UAC UUC AUC AAA UCC GUU CUU
siITG β -1 fw, duplex 2 (Maus)	CCA CAG AAG UUU ACA UUA AUU
siITG β -1 rev, duplex 2 (Maus)	UUA AUG UAA ACU UCU GUG GUU
siITG β -1 fw, duplex 3 (Maus)	GCA CAG AUC CCA AGU UUC AUU
siITG β -1 rev, duplex 3 (Maus)	UGA AAC UUG GGA UCU GUG CUU
siITG β -1 fw, duplex 4 (Maus)	CAA GAG GGC UGA AGA UUA CUU
siITG β -1 rev, duplex 4 (Maus)	GUA AUC UUC AGC CCU CUU GUU
siITG β -1, fw, duplex 1 (Ratte)	CGG CAA AUU CUG CGA GUG UUU
siITG β -1, rev, duplex 1 (Ratte)	ACA CUC GCA GAA UUU GCC GUU
siITG β -1, fw, duplex 2 (Ratte)	CGA UAG GUC CAA CGG CUU AUU
siITG β -1, rev, duplex 2 (Ratte)	UAA GCC GUU GGA CCU AUC GUU
siITG β -1, fw, duplex 3 (Ratte)	GGA CAC UGU UCC AUG CGU AUU
siITG β -1, rev, duplex 3 (Ratte)	UAC GCA UGG AAC AGU GUC CUU
siITG β -1, fw, duplex 4 (Ratte)	CCA AGU GGG ACA CGG GUG AUU
siITG β -1, rev, duplex 4 (Ratte)	UCA CCC GUG UCC CAC UUG GUU
Ezrin fw, duplex 1 (Ratte)	GGG ACU AGG CCU GUU UAU TT
Ezrin rev, duplex 1 (Ratte)	AUA AAC AGG CCU GAG UCC TT
Radixin fw, duplex 1 (Ratte)	ACC AGG CUA UCU GGC UAA UTT
Radixin rev, duplex 1 (Ratte)	AUU AGC CAG AUA GCC UGG UTT
Moesin fw, duplex 1 (Ratte)	GGC CCU GCU GCA GGC UUC UTT
Moesin rev, duplex 1 (Ratte)	AGA AGC CUG CAG CAG GGC CTT

3.1.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Firma	Kat.-Nr.
EcoR1	GAA TTC	NEB	R0101S
Xba1	TCT AGA	NEB	R0145S
Dpn1	GAT C	NEB	R0176S

Sonstige Enzyme

Enzym	Firma	Kat.-Nr.
T4 DNA Ligase	NEB	M0202S
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene	600250

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Kat.-Nr.
α -Aktin	Santa Cruz	sc-1616
α -Ezrin	Lab Vision	MS-661-P0
α -GST	Santa Cruz	sc-138
α -Integrin β -1	Chemicon	AB1952
α -Ki67	BD	556003
α -Moesin	Santa Cruz	sc-6410
α -c-Myc	Santa Cruz	sc-40
α PDGF-Rezeptor	Calbiochem	PC17
α -Radixin	Santa Cruz	sc-64108
α -Ras	Pierce	89855
α -SOS 1	Upstate	07-337
α -VSV-g	Roche	11 667 351 001

3.1.8.2 Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper (α -Maus, α -Kaninchen, α -Ziege) wurden von der Firma DAKO bezogen und waren HRP*-konjugiert.

3.1.8.3 Fluoreszenz-Antikörper

Antikörper	Konjugat	Firma	Kat.-Nr
α -BrdU	FITC	AbD Serotec	MCA 2060FT
α -BrdU	Fluorescein	Alexis	804-197L-T060
α -Maus	Alexa 488; Alexa 594	Invitrogen	A21121; A21125
Phalloidin	Alexa 488; Alexa 594	MoBiTek	A12379; A12381
DAPI		Invitrogen D1306	

3.1.9 GST-Fusionsproteine

GST-Ras wurde von der Firma Upstate bezogen. GST-Ezrin (GST-Ezrin fl) und das um dem N-terminalen und helikalen Teil verkürzte C-terminale GST-Ezrin (GST-Ezrin cterm) wurden, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt.

3.1.10 Puffer und Lösungen

Einfriermedium: DMEM; 20 % Donor Calf Serum bzw. Fetal Bovine Serum; 10 % DMSO

RF1 zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien: 30 mM Kaliumacetat auf pH 6 einstellen; 10 mM Kalziumchlorid; 15 % Glycerol; 100 mM Rubidiumchlorid; 50 mM Manganchlorid; auf pH 5,8 einstellen, steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren.

RF2 zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien: 10 mM MOPS; 10 mM Rubidiumchlorid; 75 mM Kalziumchlorid; 15 % Glycerol; auf pH 6,8 einstellen, steril filtrieren, bei -20 °C aufbewahren

LB-Medium: 1 % Trypton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 1 % Natriumchlorid

TAE-Puffer zur DNA-Elektrophorese: 24,2 % Tris; 5,71 % Eisessig; 50 mM EDTA

8 % Paraformaldehyd: 40 g Paraformaldehyd; 500 ml dest. Wasser; 1 – 5 Tropfen 10 M Natronlauge (bis zur vollständigen Auflösung des Formaldehyds in der Lösung)

modifizierter 2x Zytoskelett Puffer pH 7,0: 20 mM PIPES; 3000 mM Natriumchlorid; 10 mM EGTA; 10 mM Glucose; 10 mM Magnesiumchlorid

10 x DNase-Puffer in 1 % BSA in PBS: 25 mM Magnesiumchlorid; 5 mM Kalziumchlorid

Zellfraktionierungspuffer: 20 mM Tris-Base pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10 mM β -Mercaptoethanol; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)

IP-Puffer: 50 mM HEPES pH 7,4; 1 % NP40; 120 mM Natriumchlorid; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; 5 mM NaF; 5 mM Natrium-Orthovanadate; 0,1 % Deoxycholate; Complete-Mini Protease-Inhibitor (EDTA-frei)

Puffer für GST Pulldown: 20 mM Tris-Base pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10 mM β -Mercaptoethanol; 150 mM Natriumchlorid; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei); 0,1 % Triton X-100

GDP/GTP-Ladepuffer (Puffer A): 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM Natriumchlorid; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mg/ml BSA; 1 μ g/100 μ l GST-Agarose bzw. GST-Ras (für 500 μ l werden entweder 5 μ l GST-Agarose (Kontrolle) oder 5 μ l GST-Ras benötigt); 10 μ M GDP oder GTP

GDP/GTP-Stoppuffer (Puffer B) 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM Magnesiumchlorid; 1 mM DTT

GDP/GTP-Lysispuffer (Puffer A/B modifiziert) 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid; 5 mM Magnesiumchlorid; 1 mM DTT; 1 mg/ml BSA; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)

Glyzylglyzin-Puffer pH 7,8: 25 mM Glyzylglyzin; 15 mM Magnesiumsulfat; 4 mM EGTA

Firefly-Luciferase-Assay-Puffer(in Glyzylglyzin-Puffer): 1 mM DTT; 1 mM ATP

Coelenterazin-Stammlösung: 1 mM Coelenterazin in 90 % Methanol und 10 % HCl

Renilla-Phosphat-Puffer pH 7,6: 0,1 M Kaliumphosphat; 0,5 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA

2x SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris; 4 % SDS; 20 % Glycerol; 100 mM DTT; 0,04 % Bromphenolblau

10x Laufpuffer für Gelelektrophorese von Proteinen: 250 mM Tris; 2 M Glycin; 1 % SDS

10x Transferpuffer für Western-Blot: 250 mM Tris; 2 M Glycin; für den 1x Transferpuffer werden 10x Transferpuffer und Methanol zu gleichen Volumina gemischt und mit Wasser auf das 10-fache Volumen aufgefüllt.

10x TBS: 200 mM Tris-Base; 1,4 M Natriumchlorid

TBS-T: 1x TBS; 0,1 % Tween 20

Fixierlösung für kolloidale Coomassiefärbung (in Wasser): 40 % Methanol, 20 % Eisessig

Lösung A für kolloidale Coomassiefärbung (in Wasser): 2 % Phosphorsäure, 10 % Ammoniumsulfat, 2 % Coomassie Brillantblau G250 (5 % in Wasser). Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur kräftig gerührt.

Färbelösung für kolloidale Coomassiefärbung: 80 % Lösung A, 20 % Methanol

Strip-Lösung: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % SDS; zu je 50 ml frisch dazugeben: 385 mg DTT

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 6 % Kohlendioxyd, 95 % Luftfeuchte und 37° C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Die Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % Donor Calf Serum kultiviert. Alle anderen verwendeten Zelltypen wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % Fetal Bovine Serum kultiviert.

3.2.2 Splitten und Passagieren von adhärenenten Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS ohne Kalzium und ohne Magnesium gewaschen und für 2 Minuten mit Trypsin-Lösung (0,25 %) im Inkubator bei 37° C abgelöst. Für die Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm wurden 1,5 ml Trypsin verwendet, für die Schalen mit 15 cm Durchmesser 3 ml. Die Trypsin-Zell-Suspension wurde mit der 2,5 fachen Menge Medium verdünnt und 2 Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Danach konnten sie in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturschalen verteilt werden.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension unter dem Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

3.2.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsiniert (siehe 3.2.2) und danach in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden bei -80° C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium: DMEM; 20 % Donor Calf Serum bzw. Fetal Bovine Serum; 10 % DMSO

3.2.5 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden bei 37° C im Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in DMEM mit 10 % Serum überführt, abzentrifugiert und erneut in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension konnte danach auf Zellkulturschalen ausgebracht werden.

3.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation

Bei der Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt.

Am Vortag wurde eine Vorkultur angesetzt. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig von tiefgefrorenen Bakterien entfernt und in 5 ml 1x LB-Medium gegeben. Das Kulturröhrchen wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1 ml Kultur in 100 ml 1x LB-Medium geben und für ca 2 bis 3 Stunden bis zu einer optischen Dichte von OD=0,48 wachsen lassen. Die Bakterien-Kultur in wurde 10 Minuten mit 2500 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und jedes Pellet in jeweils 16 ml RF1 durch schütteln und klopfen resuspendiert (nicht pipettiert). Die Suspension kam für 3 Stunden auf Eis und wurde danach wieder für 10 Minuten mit 2500 Upm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt und die Pellets in jeweils 4 ml RF2 durch schütteln und klopfen resuspendiert (nicht pipettiert). Diese Bakterien-Suspension blieb 15 Minuten auf Eis stehen. Die nun chemisch kompetenten *E. coli* wurden zu je 100 μ l in Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

RF1: 30 mM Kaliumazetat auf pH 6 einstellen; 10 mM Kalziumchlorid; 15 % Glycerol; 100 mM Rubidiumchlorid; 50 mM Manganchlorid; auf pH 5,8 einstellen, steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren.

RF2: 10 mM MOPS; 10 mM Rubidiumchlorid; 75 mM Kalziumchlorid; 15 % Glycerol; auf pH 6,8 einstellen, steril filtrieren, bei -20 °C aufbewahren

3.2.7 Transformation von DNA in chemisch kompetente Zellen

Für die Transformation wurden jeweils 100 μ l chemisch kompetente Zellen (siehe 3.2.6) pro Ansatz verwendet. Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Der Transformationsmix wurde für 45 Minuten auf Eis inkubiert, danach erfolgte für 1 Minute bei 42 °C ein Hitzeschock. Die Zellen kamen danach wieder für 2 Minuten auf Eis. Zu jedem Ansatz wurden 1 ml 1x LB-Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen für 3 Minuten mit 7000 UpM abzentrifugiert und 900 ml des überstehenden Mediums wurden entfernt. Die Bakterien wurden im übrigen Medium resuspendiert und auf eine LB-Platte ausgestrichen, welche zusätzlich ein geeignetes Antibiotikum zu Selektion trägt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C. Die auf dem Selektionsmedium gewachsenen Kolonien konnten dann geerntet und für die Mini- bzw. die Maxipräparation verwendet werden.

3.2.8 Herstellung der Agar-Platten zum Ausstreichen der Bakterien

Um die Bakterien nach der Transformation auf einem geeigneten Medium wachsen zu lassen, wurde Agar-Agar in LB-Medium gelöst und mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt. Nach dem Aushärten und Abkühlen des Agar-Agars, wurden die Bakterien auf der Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert .

LB-Medium: 1 % Trypton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 1 % Natriumchlorid

Agar-Platten: 1,5 % Agar-Agar in LB-Medium; geeignetes Antibiotikum

3.2.9 Herstellung kleiner Mengen Plasmid DNA (Minipräparation)

Für diese Methode wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit verwendet. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll. Die Isolierte Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst.

3.2.10 Herstellung größerer Mengen Plasmid DNA (Maxipräparation)

Für die Maxi-Präparation wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Isolierte Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst und wenn möglich auf 1 mg/ml verdünnt.

3.2.11 Isolieren von Plasmid DNA mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen

Für den Verdau wurden in der Regel 5 μ g Vektor-DNA eingesetzt. Der Doppelverdau und die Kontrollen wurden für 2 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

3.2.12 Gelelektrophorese von DNA-Agarosegelen

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1,5 %igem Agarosegel. Es wurde mit einem Gelvolumen von 150 ml und einem TAE-Puffervolumen von 300 ml gearbeitet. Die Zugabe von 5 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) erfolgte nach dem die Agarose etwas abgekühlt war.

Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 90 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

TAE-Puffer zur DNA-Elektrophorese: 24,2 % Tris; 5,71 % Eisessig; 50 mM EDTA

3.2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel wurden die unter UV-Licht sichtbar gemachten DNA- Banden ausgeschnitten, abgewogen und mit Hilfe des Easy-Pure Kits von Biozym nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte DNA wurde anschließend in 20 μ l sterilem, autoklaviertem Wasser aufgenommen. Danach konnte die Konzentration bestimmt werden.

3.2.14 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Eppendorf-Photometer. Die DNA-Messung wurde in einer Verdünnung von 1 : 100 durchgeführt.

3.2.15 Ligation

Die Ligation der isolierten DNA mit dem gewünschten Vektor erfolgte mit T4 DNA Ligase nach dem Protokoll von New England BioLabs

3.2.16 Austausch einer Nukleotids („Site directed mutagenesis“)

Der Austausch einer oder mehreren Nukleotide wurde laut Handbuch des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt.

Anschließend erfolgte eine Transformation in chemisch kompetente Bakterien (bspw. DH5 α).

3.2.17 Transfektion eines induzierbaren Systems in NIH3T3-Zellen

Da in den Zellen nur zeitweise das exogene Ezrin-Protein exprimiert werden sollte, wurde hier ein Tet-On-System gewählt. In die zu transfizierenden Zellen musste neben der Konstrukt DNA und einem Selektions-Vektor auch ein Regulator-Plasmid eingebracht werden. Dieser Tetracyclin kontrollierte Transaktivator exprimiert ein Hybrid-Protein, welches aus dem Tet-Repressor und der VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus besteht. Als Promoter dient der konstitutiv aktive CMV-Promoter. Durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin konnte nun das gewünschte Protein in den Zellen exprimiert werden.

Als Selektionsvektor wurde pBabe gewählt, welches eine Selektion mit Puromycin erlaubte.

Die Transfektionen erfolgten mit Lipofectamine 2000 von Invitrogen.

3.2.18 Verringerung der Proteinmenge mittels siRNA

Um in den Zellen die Menge an verfügbarem Protein zu verringern, wurden spezifische siRNAs eingesetzt, welche an die jeweilige mRNA binden. Diese werden in der Folge degradiert und damit für die Translation unbrauchbar.

Die Transfektion der jeweiligen siRNA-Duplexe erfolgte mit Lipofectamine 2000 von Invitrogen. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

3.2.19 Langzeit-Messung der Proliferation

Durch dieses Langzeitexperiment konnte die Wachstumsrate transfizierter Zellen bzw. Kontrollzellen verglichen werden. Die Zellen wurden über 6 Tage gezählt und in einem Diagramm aufgezeichnet. In einer 24-well Platte wurden je Vertiefung 5×10^3 Zellen ausgesät. Zur größtmöglichen Genauigkeit wurden jeweils 3 Vertiefungen für nicht-induzierte Zellen und für induzierte Zellen ausgebracht. Das Medium wurde nach 3 Tagen gewechselt und das Doxycyclin erneuert.

Die Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ Trypsin von der Oberfläche gelöst, mit $100 \mu\text{l}$ Vollmedium verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Auswertung erfolgte aus den jeweils 3 Ansätzen, die Standardabweichung wurde berechnet und das Ergebnis in ein Diagramm übertragen.

3.2.20 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

3.2.20.1 Herstellen der Paraformaldehyd-Lösung in modifiziertem Zytoskelett Puffer pH 7,0

Die 4%ige Paraformaldehyd-Lösung wurde aus modifiziertem 2x Zytoskelett-Puffer (pH 7,0) und 8%iger Paraformaldehyd-Lösung hergestellt.

Bei der Herstellung der Paraformaldehydlösung wurden alle Schritte unter dem Abzug durchgeführt.

8 % Paraformaldehyd: 40 g Paraformaldehyd; 500 ml dest. Wasser; 1 – 5 Tropfen 10 M Natronlauge (bis zur vollständigen Auflösung des Formaldehyds in der Lösung)

modifizierter 2x Zytoskelett Puffer pH 7,0: 20 mM PIPES; 3000 mM Natriumchlorid; 10 mM EGTA; 10 mM Glucose; 10 mM Magnesiumchlorid

3.2.20.2 Fixieren und Permeabilisieren der Zellen

Für die Fixierung wurden die Zellen mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert (0,5 ml, 1 Minute, RT). Nach diesem Schritt wurden die Zellen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Für die anschließende Immunofluoreszenzfärbung wurden die Zellen nun 1 Stunde mit 1 % BSA (in PBS) geblockt und danach mit den gewünschten Antikörpern behandelt.

3.2.20.3 BrdU Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/ml auf Deckgläschen ausgesät. Dafür lag jeweils 1 Deckglas in einer Vertiefung einer 12well Platte. Zunächst erfolgte

eine Inkubation über 4 Stunden mit Bromodeoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 50 μM /well.

Die Fixierung der Zellen erfolgte wie im Abschnitt Fixieren und Permeabilisieren der Zellen beschrieben.

Pro Deckglas wurden 10 μl eines Master-Mixes aus DAPI, α -BrdU/Fluorescein, 10 x DNase-Puffer, DNase und α -myc/TRITC verwendet

Die Zellen konnten danach 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und direkt auf Objektträger aufgebracht werden. Dafür wurde ein non-bleaching Mounting-Medium verwendet, welches dafür sorgt, dass die Fluoreszenzfarbstoffe nicht ausbleichen. Nach dem Aushärten des Einbettmediums konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzlicht betrachtet werden.

DNase: 10U/ μl

10 x DNase-Puffer in 1 % BSA in PBS: 25 mM Magnesiumchlorid; 5 mM Kalziumchlorid

Antikörper-Mix: 40 μl DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 40 μl α -BrdU-Fluorescein (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 10 μl 10x DNase-Puffer; 10 μl DNase; 2 μl α -myc-TRITC (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

3.2.20.4 Phalloidin Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Das Ausbringen der Zellen und die Fixierung erfolgte auf die gleiche Weise, wie dies für die BrdU-Immunofluoreszenz beschrieben wurde.

Der Antikörpermix bestand aus DAPI, α -myc/TRITC und Phalloidin/Alexa 488. Auch hier wurde für 1 Stunde inkubiert und danach 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Zum Aufbringen auf Objektträger wurde ein nicht ausbleichendes Mounting-Medium verwendet, welches dafür sorgt, dass die Fluoreszenzfarbstoffe nicht ausbleichen. Nach dem Aushärten des Einbettmediums konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzlicht betrachtet werden. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt am Mikroskop mit den Filtern, die für die entsprechenden Wellenlängen geeignet sind.

Antikörper-Mix: 96 μl DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 2 μl Phalloidin/Alexa 488; 2 μl α -myc-TRITC (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

3.2.21 Zellfraktionierung für SDS-PAGE

Es wurden 1×10^6 Zellen ausgesät. Die Lyse erfolgte in 5 ml Puffer A. Diese Suspension wurde danach mehrmals durch eine Spritze mit 26 g-Kanüle gezogen, um die DNA zu scheren. Die erste Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 4 °C mit 400 g. Der Überstand wurde weitere 45 Minuten bei 100000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet

wurde 2x mit Puffer A gewaschen und anschließend in Puffer A mit 1 % Triton X-100 resuspendiert. Das Puffervolumen entsprach dem Lysis-Volumen. Die Suspension wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und während dessen regelmäßig leicht gevortext. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 g für 20 Minuten bei 4 °C. Im Überstand waren die Membrane fraktioniert und konnten gegen die Zytosolfraktion und gegen das Gesamtlysate auf einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Proteine wurden anschließend im Western-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Puffer A: 20 mM Tris-Base pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10 mM β -Mercaptoethanol; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)

3.2.22 Immunopräzipitation (IP)

Je Zellkulturschale wurden 5×10^5 Zellen ausgebracht. Falls die Versuche mit stabil transfizierten Zellen (Tet-On-System) durchgeführt wurden, wurde die Hälfte der Schalen am nächsten Tag mit Doxycyclin behandelt (Kontrollen bzw. Ezrin-Expression im induzierbaren Tet-On-System). Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen in Vollmedium, Hungermedium oder Hungermedium mit anschließender Stimulierung durch Wachstumsfaktoren kultiviert.

Zum Aufarbeiten und Lysieren wurden die Zellen in 500 μ l IP-Puffer mit Hilfe eines Gummiwischers vollständig von der Schalenoberfläche entfernt. Die Zellkerne wurden für 10 Minuten bei 4 °C mit 13000 UpM abzentrifugiert. 50 μ l des Überstandes wurden in ein separates Reaktionsgefäß gegeben und mit dem gleichen Volumen 2x Proben-Puffer sowie 5 mM DTT versetzt, um später eine Probe des Gesamtlysats auftragen zu können.

Der verbleibende Überstand wurde in gleiche Volumina geteilt. Ein Teil wurde mit dem spezifischen Antikörper in einer Verdünnung von 2 μ g/ml der andere Teil mit Maus IgG in der selben Konzentration versetzt (Negativkontrolle). Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht im Kühlraum bei 4 °C rotieren gelassen.

In jedes Reaktionsgefäß wurden 30 μ l Agarose-Beads zugeben (hier: G/A) und für 2 Stunden bei 4 °C (Kühlraum) rotieren gelassen (s. o.). Die Beads wurden 1 Minute bei 4 °C mit 5000 UpM abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend vier mal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen und abzentrifugiert (s.o.). Das Agarose-Pellet wurde mit 50 μ l 2x Proben-Puffer und mit 5 mM DTT versetzt und 3 Minuten auf 95 °C erhitzt.

Anschließend erfolgte je nach Versuchsaufbau SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und/oder das Färben der Proteine mittels kolloidalem Coomassie.

IP-Puffer: 50 mM HEPES pH 7,4; 1 % NP40; 120 mM Natriumchlorid; 1 mM EGTA; 1 mM EDTA; 5 mM NaF; 5 mM Natrium-Orthovanadate; 0,1 % Deoxycholate;

Complete-Mini Protease-Inhibitor (EDTA-frei)

3.2.23 Herstellung von GST Fusionsproteinen

20 ml LB-Medium wurde mit *E. coli* angeimpft, welche die GST-Fusions-Konstrukte trugen und bei 37 °C unter Schütteln (200 UpM) bis zu einer OD=0,5 inkubiert. Die Expression des GST-Fusionsprotein wurde mittels 0,1 mM IPTG (Iso propyl-β-D-thio galactopyranosid) gestartet. Die anschließende Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln (200 UpM). Die Bakterien wurden für 5 Minuten bei 5000 UpM abzentrifugiert, zwei mal mit kalten PBS gewaschen und anschließend für mindestens eine Stunde bis über Nacht bei -80 °C gelagert.

Um die Bakterien zu Lysieren, wurden diese in kaltem PBS, welches Protease-Inhibitoren (Complete Mini) enthielt, sonifiziert. Zu dem Lysat wurde anschließend 1 ml einer 10 %igen Triton X-100 Lösung gegeben und für 20 Minuten unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Nachdem das Lysat für 10 Minuten bei 4 °C mit 12000 UpM abzentrifugiert wurde, konnte der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden, welches 400 µl einer 50 %igen Sepharose-Aufschlämmung (Sepharose 4B) in PBS enthielt.

Die so an die Sepharose gebundenen Fusionsproteine konnten nach weiteren 2 Stunden Inkubation (unter Rotieren) bei 4 °C 3 mal in kaltem PBS gewaschen und bei -80 °C gelagert werden.

3.2.24 Abspalten der GST-Sequenz von GST-Fusionproteinen

Für das Pull Down Experiment, in welchem bakteriell exprimiertes Ezrin und bakteriell exprimiertes Ras eingesetzt wurden, um die direkte Bindung zwischen beiden nachzuweisen, musste von einem der Proteine das GST entfernt werden. Dies geschah durch Abspaltung mittels Thrombin, da diese Fusionsproteine eine Thrombin-Erkennungssequenz trugen.

Es wurden pro µg Fusionsprotein 2 U Thrombin eingesetzt und zu den Sepharose gebundenen Fusionsproteinen gegeben. Nach 2 bis 16 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur konnte das gereinigte Proteine durch Zentrifugation bei 4 °C entfernt werden. Die sich im Überstand befindenden, abgespaltene Proteine konnte so für die Experimente eingesetzt werden.

3.2.25 GST Pulldown

3.2.25.1 GST-Ezrin oder GST-Ras Pulldown

Je Zellkulturschale wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgebracht. Falls die Versuche mit stabil transfizierten Zellen (Tet-On-System) durchgeführt wurden, wurde die Hälfte der Schalen am nächsten Tag mit Doxycyclin behandelt (Kontrollen bzw. Ezrin-Expression im induzierbaren Tet-On-System). Die Zellen wurden in Vollmedium gezogen.

Zur Aufarbeitung und Lyse wurden die Zellen in $500 \mu\text{l}$ Puffer mit Hilfe eines Gummiwischers vollständig von der Schalenoberfläche entfernt. Die Zellkerne wurden für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 UpM abzentrifugiert. $50 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden in ein separates Reaktionsgefäß gegeben und dem gleichen Volumen 2x Proben-Puffer sowie 5 mM DTT versetzt, um später eine Probe des Gesamtlysats auftragen zu können.

Wurde ein GST-Ezrin Pulldown durchgeführt, so wurden $10 \mu\text{l}$ GST-Ezrin Agarose zum Lysat gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlraum. Nach 3 maligem Waschen mit Lysis-Puffer wurde die GST-Ezrin Agarose mit $50 \mu\text{l}$ 2x Probenpuffer und 5 mM DTT versetzt und für 3 Minuten auf 96°C erhitzt. Anschließend erfolgte SDS-PAGE, Western-Blot und Detektion gegen die entsprechenden Antikörper.

Um eventuell vorhandene Protein-Komplexe an Ras nachzuweisen, wurden $10 \mu\text{l}$ GST-Ras Agarose zum Lysat gegeben und ü/N im Kühlraum rotieren lassen. Nach 3x waschen im Lysis-Puffer wurden die gewaschenen Beads mit $50 \mu\text{l}$ 2x Probenpuffer und 5 mM DTT versetzt und für 3 Minuten auf 96°C erhitzt.

Anschließend erfolgte SDS-PAGE, Western-Blot und Detektion gegen die entsprechenden Antikörper.

Puffer für GST Pulldown: $20 \text{ mM Tris-Base pH } 7,5$; 2 mM EDTA ; $0,5 \text{ mM EGTA}$; $10 \text{ mM } \beta\text{-Mercaptoethanol}$; $150 \text{ mM Natriumchlorid}$; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei); $0,1 \%$ Triton X-100

3.2.25.2 Beladen von GST-Ras mit GDP bzw. GTP

Je Zellkulturschale wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen ausgebracht. Für Versuche mit stabil transfizierten Zellen (Tet-On-System) wurden die Zellen am nächsten Tag mit Doxycyclin behandelt. Die Zellen wurden in Vollmedium gezogen.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummiwischers in $500 \mu\text{l}$ Lysis Puffer aufgenommen und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Je Reaktionsgefäß wurden $200 \mu\text{l}$ einer Mischung aus Puffer A und Puffer B benötigt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 4°C , danach erfolgte SDS-PAGE, Western-Blot und die Detektion der Proteine mit den entsprechenden Antikörpern.

GDP/GTP-Ladepuffer (Puffer A): 50 mM Tris pH 7,5; 50 mM Natriumchlorid; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mg/ml BSA; 1 μ g/100 μ l GST-Agarose bzw. GST-Ras (für 500 μ l werden entweder 5 μ l GST-Agarose (Kontrolle) oder 5 μ l GST-Ras benötigt); 10 μ M GDP oder GTP

20' bei RT rotieren lassen. Danach 1:1 mit Puffer B mischen

GDP/GTP-Stoppuffer (Puffer B) 50 mM Tris pH 7,5; 10 mM Magnesiumchlorid; 1 mM DTT;

GDP/GTP-Lysispuffer (Puffer A/B modifiziert) 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM Natriumchlorid; 5 mM Magnesiumchlorid; 1 mM DTT; 1 mg/ml BSA; Complete-Mini Protease Inhibitor (EDTA-frei)

3.2.26 Ras-Aktivierungs-Assay

Es wurden 5×10^5 Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Vollmedium gegen Hungermedium ausgetauscht und in der Hälfte der ausgesäten Platten wurde die Expression des Ezrin-Proteins induziert (falls die Versuche mit stabil transfizierten Zellen (Tet-On-System) durchgeführt wurden). Am nächsten Tag konnte nun die Aktivierung des Signalwegs mit dem Wachstumsfaktor erfolgen. Die PDGF-Aktivierung (10 ng/ml) erfolgte für 2 Minuten bei 37 °C.

Für diesen Assay wurde das EZ-Detect Ras Activation Kit von Pierce verwendet. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

3.2.27 Luziferase-Assay

Für diesen Assay wurden 1×10^3 Zellen in eine 96well-Platte (mit flachem Boden) ausgesät; Für jede Messung wurden 3 Ansätze ausgebracht. Die Lyse der Zellen erfolgte mit einem 1x Passiv Lyse-Puffer von Promega (5x Stock) für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Glyzylglyzin-Puffer pH 7,8: 25 mM Glyzylglyzin; 15 mM Magnesiumsulfat; 4 mM EGTA

Firefly-Luciferase-Assay-Puffer(in Glyzylglyzin-Puffer): 1 mM DTT; 1 mM ATP

Luziferin-Stammlösung: 1 mM Luziferin in Glyzylglyzin-Puffer

Luziferin-Gebrauchslösung: Luziferin-Stammlösung 1:5 in Glyzylglyzin-Puffer pH 7,8

Coelenterazin-Stammlösung: 1 mM Coelenterazin in 90 % Methanol und 10 % HCl

Coelenterazin-Gebrauchslösung: 1 μ l Coelenterazin-Stammlösung in 8 ml Renilla-Phosphat-Puffer

Renilla-Phosphat-Puffer pH 7,6: 0,1 M Kaliumphosphat; 0,5 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA

Renilla-Reaktions-Puffer: Renilla-Phosphat-Puffer pH 7,6 2:9 in Coelenterazin-Gebrauchslösung

3.2.28 Gelelektrophorese von Proteinen in SDS-Gelen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Dafür wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt und zum Denaturieren 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 40 mA je Gel. Zur Größenbestimmung wurde ein Marker mit definierten Proteingrößen aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Westernblot) und mit geeigneten Antikörpern detektiert.

2x SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris; 4 % SDS; 20 % Glycerol; 100 mM DTT; 0,04 % Bromphenolblau

10x Laufpuffer für Gelelektrophorese von Proteinen: 250 mM Tris; 2 M Glycin; 1 % SDS

3.2.29 Färben von SDS-Gelen (kolloidales Coomassie)

Vor dem Färben wurde das Gel für 1 Stunde bei Raumtemperatur entwässert und anschließend fixiert. Die Färbung der Proteine erfolgte für mindestens 3 Stunden bis über Nacht. Anschließend wurde das Gel mit Wasser entfärbt.

Fixierlösung (in Wasser): 40 % Methanol, 20 % Eisessig

Lösung A (in Wasser): 2 % Phosphorsäure, 10 % Ammoniumsulfat, 2 % Coomassie Brilliantblau G250 (5 % in Wasser). Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur kräftig gerührt.

Färbelösung: 80 % Lösung A, 20 % Methanol

3.2.30 Western-Blot und immunochemische Detektion von Proteinen

Die Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden waren, wurden auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 20 V. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen je nach Antikörper-Protokoll entweder in 5 % Magermilchpulver in TBS/T, oder in 3 % BSA in TBS/T geschwenkt. Die Konzentration der primären und sekundären Antikörper richtete sich nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers.

Die Detektion der Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte entweder mit ECL oder mit ECL plus (Pierce) nach Angaben des Herstellers. Die Signale wurden mit einem lichtempfindlichen Film detektiert.

10x Transferpuffer für Western-Blot: 250 mM Tris; 2 M Glycin; für den 1x Transferpuffer werden 10x Transferpuffer und Methanol zu gleichen Volumina gemischt und mit Wasser auf das 10-fache Volumen aufgefüllt.

10x TBS: 200 mM Tris-Base; 1,4 M Natriumchlorid

TBS-T: 1x TBS; 01 % Tween 20

3.2.31 Entfernen von sekundären Antikörpern von einer Membran (Strippen)

Um Antikörper von einer Membran zu entfernen, wurde diese für 30 Minuten bei 57 °C in einer Stripp-Lösung geschüttelt und danach für mindestens 30 Minuten mit TBS-T gewaschen.

Strip-Lösung: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % SDS

zu je 50 ml frisch dazugeben: 385 mg DTT,

4 Ergebnisse

Basierend auf den Hinweisen, dass ERM-Proteine an Ko-Rezeptoren binden und dadurch für die Signaltransduktion im Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg essentiell sind, wurde diese Arbeit erstellt. Um die mögliche Rolle von Ezrin/ERM in der RTK-abhängigen Ras-Aktivierung zu untersuchen, habe ich zunächst die zelluläre Menge von ERM-Proteinen manipuliert. Eine Erhöhung der Ezrin-Konzentration wurde mittels eines regulierbaren Expressionskonstrukt erreicht. Sollte dagegen die Menge an Ezrin, beziehungsweise die Radixin- und Moesinmenge, verringert werden, so erfolgte dies mittels spezifischer siRNA.

Für alle Experimente wurden entweder Ratten-Schwannoma Zellen (RT4-D6P2T) oder Mausfibroblasten (NIH3T3) verwendet.

Die Ratten-Schwannoma-Zellen sind transformierte Zellen, besitzen aber eine große Menge an endogenen ERMs und erlauben es daher die Komplexe in einem unveränderten System zu testen. Zudem wurden auch die schon veröffentlichten Ergebnisse in diesem System ermittelt.

Mausfibroblasten dagegen sind nicht-transformierte, immortalisierte Zellen und in ihnen ist nur eine geringe Menge an endogenem Ezrin vorhanden, was es erlaubt eine genauere Aussage über die Wirkung einer Überexpression zu treffen. Außerdem sollte dadurch ein weiteres System involviert werden, um die Allgemeingültigkeit der Aussagen zu überprüfen. Mausfibroblasten haben zudem den Vorteil, dass ohne weiteres ein Serumentzug durchgeführt werden kann. Beide Zelllinien, sowohl Ratte als auch Maus, erlauben eine Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF.

4.1 Ein ERM Knock Down führt zu Inhibierung der Ras-Aktivierung

Um zunächst nachzuweisen, dass ERM-Proteine in die Ras-Aktivierung involviert sind, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem die Menge an verfügbaren ERM-Proteinen reduziert wurde (Knock Down). Da ERM-Proteine sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können, wurde die Proteinmenge dadurch reduziert, dass eine Mischung von siRNA eingesetzt wurde, welche alle 3 ERM-Proteine zum Ziel hatte (Abb 4.1).

In diesem Experiment, welches in Schwannoma Zellen (Ratte) durchgeführt wurde, erfolgte die Stimulation des Ras-MAP-Kinase Signalwegs mittels PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), welches an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGF-R bindet. Die Stimulation mit 10 ng/ml PDGF erfolgte für 2 Minuten bei 37 °C.

Ich konnte zeigen, dass eine Inhibierung des Signalwegs nach ERM Knock Down eintrat, was durch die Abnahme GTP-gebunden Ras detektiert wurde. Diese Verringerung zeigte sich sowohl im basalen Bereich, in welchen keine Stimulation durch Wachstumsfaktoren erfolgte, als auch im PDGF induzierten Bereich. Zudem ist der Grad der Ras-Aktivierung in den Zellen, welche mit siERM behandelt wurden, geringer, als in den Kontrollen (densitometrische Messung nicht gezeigt).

Durch dieses Knock Down Experiment ließ sich zeigen, dass ERM-Proteine eine Schlüssel-Funktion in der Signaltransduktion besitzen.

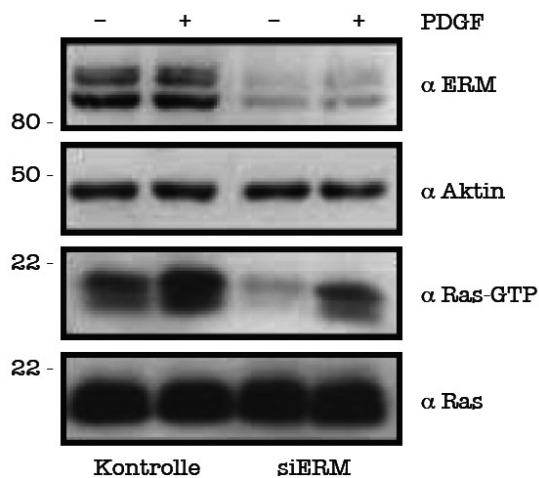


Abbildung 4.1: Durch spezifische siRNAs wurde die Menge aller ERM-Proteine reduziert. Dadurch ließ sich die Aktivierung von Ras inhibieren. Transfiziert wurde entweder siRNA gegen alle ERMs oder Kontroll-siRNA, welche unspezifisch bindet. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine 2000 laut Angaben des Herstellers. Die Inkubationszeit der siRNA betrug 72 Stunden, danach wurde das Medium gegen Hungermedium ausgetauscht. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit 10 ng/ml PDGF stimuliert und wie im Methodenteil beschrieben, aufgearbeitet.

4.2 ERM-Proteine sind in Komplexen zu finden

4.2.1 ERM-Proteine bilden zusammen mit Ras und SOS einen Komplex

Wie können ERM-Proteine Ras aktivieren? Ein Weg dies herauszufinden, ist, zu fragen, womit ERMs interagieren.

Im Falle des Transmembranproteins CD44 konnte eine Beteiligung an der Aktivierung

des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs als Ko-Rezeptor gezeigt werden. Der extrazelluläre Teil von CD44v6 wird für die Autophosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met benötigt, der zytoplasmatische Teil bindet an ERMs [70, 74]. Daher lag es nahe, zu untersuchen, ob sowohl Ras und ERMs, als auch SOS – welches für den Nukleotidaustausch an Ras benötigt wird – in einem gemeinsamen Komplex zu finden sind.

In Immunopräzipitationen (IP) aus proliferierenden Zellen gegen einen SOS-Antikörper konnte ich sowohl Ras, als auch ERMs im Western-Blot nachweisen (Abb 4.2).

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass ERMs mit SOS beziehungsweise mit Ras interagieren. Allerdings zeigte dieses Experiment nicht, ob ERMs eine Rolle im Ras-Signalweg spielen. Sollte dieser Komplex in die Ras-Aktivierung involviert sein, müsste er unter der Kontrolle eines Wachstumsfaktor im Serum stehen.

4.2.2 Integrin β -1 befindet sich in einem Komplex zusammen mit Ezrin

Um den Faktor zu identifizieren, habe ich die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert und dann einen definierten Wachstumsfaktor zugegeben. Durch Zugabe des Wachstumsfaktor PDGF zu Zellen, die über Nacht in Hungermedium inkubiert wurden, kann im Western-Blot eine Zunahme des aktiven, GTP-gebundenen Ras detektiert werden, da durch den Wachstumsfaktor der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg aktiviert wird.

Werden RT4-Zellen mit Wildtyp-Ezrin transfiziert und mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert, kann die Menge des aktiven Ras noch erhöht werden, da exogenes Ezrin überexprimiert wird. Dies zeigt sich in einem Ras-Aktivierungs-Assay durch die Zunahme des GTP-gebundenen Ras (Helen Morrison, nicht veröffentlicht).

PDGF ist der spezifische Wachstumsfaktor für die Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGF-Rezeptor (PDGF-R), Ko-Rezeptor für den PDGF-Rezeptor ist Integrin β -1 [120]. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass Integrin β -1 auch an Ezrin binden kann und somit auch in einem Komplex zusammen mit ERMs und dem PDGF-Rezeptor präzipitiert werden kann. Um dies zu untersuchen wurde eine IP aus Zelllysate von RT4-Zellen durchgeführt.

Für diese IP (Abb 4.3), welche gegen den PDGF-Rezeptor durchgeführt wurde, wurden die Zellen zunächst über Nacht in Hungermedium inkubiert, um eine Stimulation des Ras-Signalwegs zu verhindern. Im anschließenden Versuch wurden der Signalweg in einem Teil der Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert. Die Immunopräzipitation von Extrakten stimulierter Zellen zeigte, dass hier eine Komplexbildung zwischen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase PDGF-Rezeptor, ERMs und Integrin β -1 stattfand. Mit Extrakten aus nicht-stimulierten Zellen war dieser Komplex nicht nachweisbar.

Mit diesem Versuch konnte zwar gezeigt werden, dass Integrin β -1 nach PDGF-Stimulation zusammen mit PDGF-R und ERMs einen Komplex ausbildet, aber nicht, ob Integrin β -1 tatsächlich ein spezifischer Ko-Rezeptor für den PDGF-stimulierten Ras-

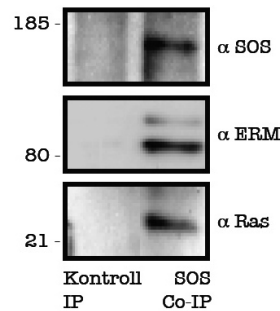


Abbildung 4.2: In einer Ko-Immunopräzipitation gegen den SOS kann ein Komplex aus SOS, ERM-Proteinen und Ras nachgewiesen werden. Für die IP wurde anti-SOS 1 in einer Konzentration von $2\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Als Detergenz wurde NP-40 verwendet. Für den Nachweis der ERM-Proteine, wurden Antikörper gegen Ezrin, Radixin und Moesin verwendet. Als Kontrolle wurde Zelllysat verwendet, welches mit unspezifischem (Ig G) behandelt wurden.

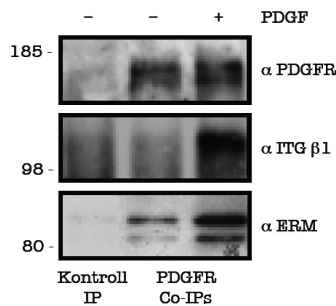


Abbildung 4.3: In einer Immunopräzipitation gegen den PDGF-Rezeptor kann nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF ein Komplex aus PDGF-Rezeptor, Integrin β -1 und ERM-Proteinen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit PDGF erfolgte in einer Konzentration von 10 ng/ml für 2 Minuten bei 37°C , nach dem die Zellen für 12 Stunden in Hungermedium inkubiert wurden. Der Antikörper gegen den PDGF-Rezeptor β wurde in einer Konzentration von $2\mu\text{g/ml}$ eingesetzt

Signalweg ist. Eine Möglichkeit, dies zu klären, wäre ein Minimieren von Integrin β -1 mittels spezifischer siRNA (Knock Down).

4.3 Ein Integrin β -1 Knock Down führt zur verminderten Antwort im Ras/MAP-Kinase Signalweg

Falls Integrin β -1 ein Ko-Rezeptor für PDGF-R ist, so müsste eine Transfektion mit spezifischer siRNA gegen Integrin β -1 und die anschließende Stimulation mit PDGF zu einer verminderten Aktivierung von Ras führen.

In einem Knock Down Experiment wurde Integrin β -1 mittels siRNA reduziert, als Kontrollen wurden unspezifische siRNAs benutzt, welche keinen Einfluss auf Integrin β -1 haben. Für dieses Experiment (Abb 4.4) wurden Mausfibroblasten verwendet, welche sich über längere Zeit in Hungermedium inkubieren lassen.

Im Falle der Kontrolltransfektion konnte eine Zunahme von aktivem, GTP-gebundenem Ras nach PDGF-Stimulation detektiert werden. Nachdem die Zellen, welche mit spezifischer siRNA transfiziert, über Nacht in Hungermedium inkubiert und danach mit PDGF stimuliert wurden, zeigte sich allerdings, dass keine Zunahme von GTP-gebundenem Ras erfolgte.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass Integrin β -1 tatsächlich ein spezifischer Ko-Rezeptor für PDGF und PDGF-Rezeptor sind.

Die bisher durchgeführten Versuchen zeigten, dass ERM-Proteine nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren zusammen mit RTKs, Ko-Rezeptoren und SOS in einem

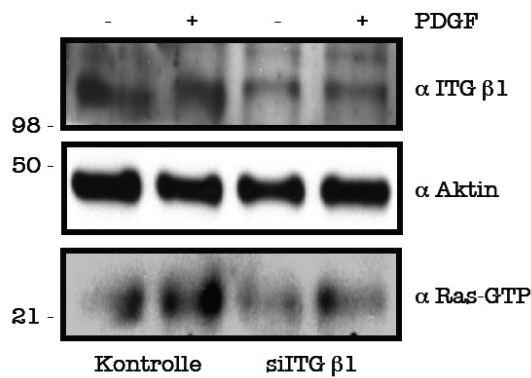


Abbildung 4.4: Der Ko-Rezeptor Integrin β -1 wurde mit Hilfe von spezifischer siRNA vermindert. Auch nach Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF konnte keine Aktivierung des Ras-Signalwegs gezeigt werden.

gemeinsamen Komplex zu finden sind. Daher stellte sich zunächst die Frage, wie die Signalweiterleitung – ausgehend von Ezrin – erfolgt.

4.4 Das N-terminale Ende von Ezrin hat strukturelle Ähnlichkeiten mit einer Raf-Ras-Bindedomäne

Schaut man sich den N-Terminus von Ezrin genauer an, zeigt sich, dass die Bindung an Ko-Rezeptoren in dieser N-terminalen FERM-Domäne stattfindet [76]. In dieser Domäne befindet sich außerdem eine Sequenz, die einer Raf-Ras-Bindedomäne (Raf-RBD) ähnelt [97] (Abb 4.5). Mit Hilfe eines 3D-Computerprogramms (Cn3D) konnte dies dargestellt werden (Abb 4.6). Mit Hilfe dieses Computerprogramms konnte sowohl die sequenzielle Übereinstimmung bestimmt, als auch die Ladungsverteilungen dargestellt werden, da dies bei der Suche der in Raf entsprechenden Aminosäuren wichtig war.

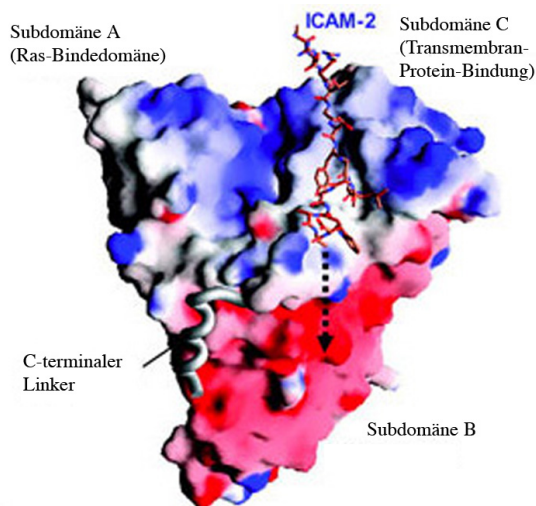


Abbildung 4.5: Die FERM-Domäne von ERMs besteht aus verschiedenen Subdomänen (nach Hamada et al., 2003). In Subdomäne A befindet sich eine Raf-RBD-ähnliche Struktur, in Subdomäne C erfolgt die Bindung an Ko-Rezeptoren.

In einer Raf-RBD kann nur GTP-Ras binden. Raf-Proteine – in der Signalkaskade weiter unten liegende Interaktionspartner von GTP-Ras – liegen normalerweise inaktiv

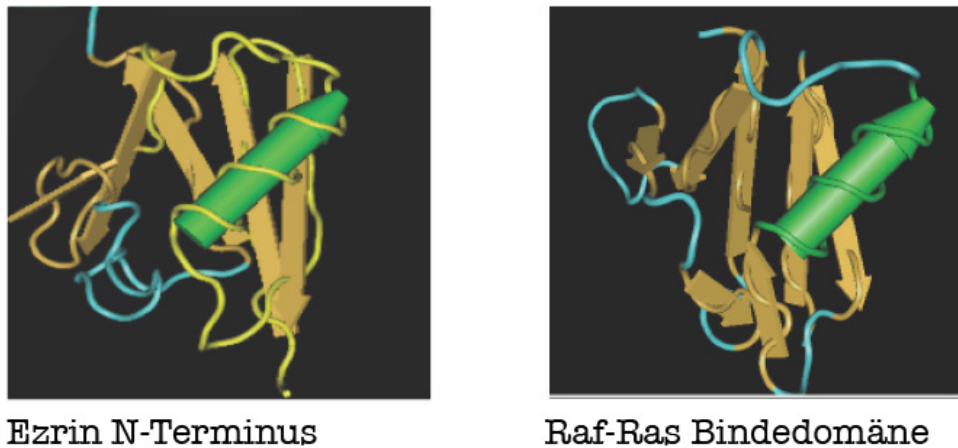


Abbildung 4.6: Der direkte Vergleich von Ezrin-N-Terminus mit der Raf-Ras-Bindedomäne zeigte eine hohe strukturelle Übereinstimmung.

im Zytosol vor, werden dann aber durch Aktivierung, das heißt durch GTP-Beladung von Ras, an der Zellmembran lokalisiert [30]. Ist dies geschehen, so kann die Signaltransduktion über MEK und Erk erfolgen und endet schließlich in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, was in der Folge zur Aktivierung von Fos und Jun, und damit schließlich zur Proliferation führt.

4.5 N-terminales Wildtyp-Ezrin kann an Ras binden

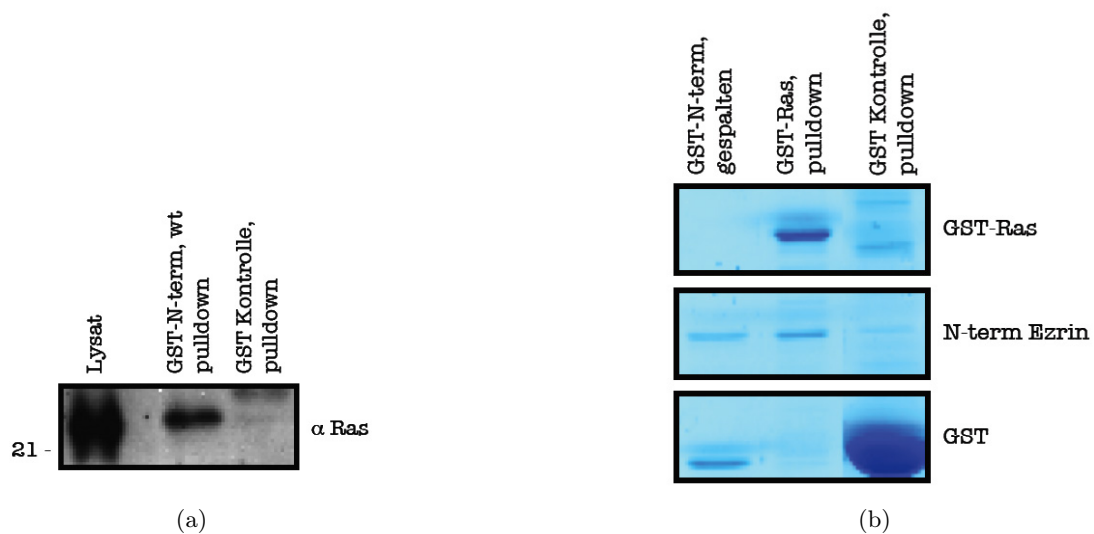
Es stellte sich die Frage, ob diese Raf-RBD-ähnliche Struktur wie in Raf ebenfalls zur Bindung von Ras dient. Wäre dies der Fall, so ließe sich diese Bindung experimentell nachweisen.

Zunächst wurde mit bakteriell exprimiertem GST-N-terminalem Ezrin ein Pull Down-Experiment durchgeführt (Abb 4.7 a). Dafür wurde Zelllysate aus NIH3T3-Zellen verwendet. Ich konnte zwar nachweisen, dass eine Bindung zwischen dem N-terminalen Teil von Ezrin, welcher die Raf-RBD-Struktur trägt, an Ras bindet, eine Aussage über eine direkte/indirekte Bindung ließ sich aber daraus nicht ableiten.

Ob diese Bindung direkt stattfindet, konnte ich durch die Verwendung gereinigter Komponenten nachweisen, in dem neben GST-N-terminalem Ezrin, bei welchem die Glutathion-S-Transferase (GST) abgespalten wurde, auch GST-Ras eingesetzt wurde (Abb 4.7 b). Um die Proteine im SDS-Gel nachzuweisen, wurde hier eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt, da diese Art der Protein-Detektion wesentlich empfindlicher ist, als ein Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

Es zeigte sich, dass sich auch in diesem Experiment eine Ezrin/Ras-Bindung nachweisen ließ, was auf eine direkte Bindung zwischen Ras und Ezrin hinweist.

Soweit stellte sich folgendes Bild dar: Ezrin geht im Falle der Aktivierung des Ras/MAP-

**Abbildung 4.7:**

- a) In einem Pull-down, in dem bakteriell exprimiertes N-terminales Ezrin eingesetzt wurde, konnte aus Zell-lysate (NIH3T3) Ras detektiert werden.
 b) In einem Pull-down, in dem sowohl bakteriell exprimiertes N-terminales Ezrin, als auch bakteriell exprimiertes GST-Ras eingesetzt wurde, konnte Ras detektiert werden. Mit einer Coomassie-Färbung (kolloidales Coomassie) wurden die eingesetzten Proteine sichtbar gemacht.

Kinase Signalwegs eine Komplex mit RTKs, Ko-Rezeptoren und SOS ein, zusätzlich bindet Ras. Um nachzuweisen, ob diese direkte Bindung auch Einfluss auf die Aktivierung des Ras-Signalwegs hat, war es notwendig eine Mutation zu finden, welche kein Ras mehr binden kann, und diese in den N-Terminus von Ezrin einzubringen.

4.6 Eine Mutation im N-Terminus von Ezrin kann die Bindung an Ras inhibieren

In verschiedenen Veröffentlichungen wurden Mutationen in Raf beschrieben, die eine Inhibierung der Ras-Aktivierung zur Folge hatten [97, 121]. In der Annahme, dass die FERM-Ras-Interaktion dem gleichen Prinzip unterliegt, habe ich die entsprechenden Mutationen eingeführt und auf Bindung getestet. So wurden Punktmutationen an Position Glutamin 21 (Q21A), Lysin 34 (K34A) und an Arginin 39 (R40L) eingebracht, aber nur im Falle der Punktmutation an Position 39, bei der Arginin durch Leuzin ersetzt wurde, konnte auch eine Inhibierung der Ras-Bindung nachgewiesen werden.

Der Versuchsaufbau des Pull Downs (Abb 4.8) glich im Wesentlichen dem in 4.5 beschriebenen Pull Down. Hier wurde zusätzlich die ebenfalls bakteriell exprimierte Ezrin-Mutante R40L verwendet. Es zeigte sich, dass endogenes Ras nicht mehr an die mutierte FERM-Domäne binden konnte.

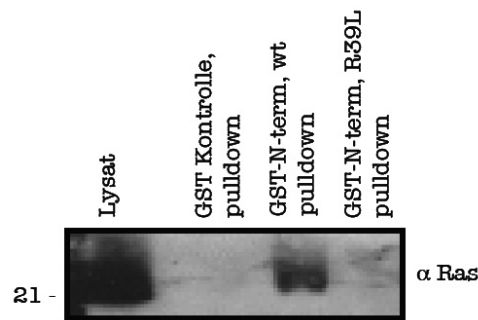


Abbildung 4.8: In einem Pull-down, in dem bakteriell exprimiertes N-terminales Ezrin und die Mutante R40L eingesetzt wurde, konnte aus einem Zelllysate (NIH3T3) nur im Falle des Wildtyps Ras detektiert werden. Im Falle der Mutation ist diese Detektion nicht möglich.

4.7 Eine Mutation im N-Terminus hat keinen Einfluss auf die Lokalisierung von Ezrin in der Zelle

In der FERM-Domäne binden neben Ras aber auch Ko-Rezeptoren wie CD44 [70, 74] oder Integrin β -1. Es wäre daher möglich, dass eine Mutation in dieser Domäne auch einen negativen Einfluss auf die Bindung an Ko-Rezeptoren hat. Um dies zu testen, wurden Mausfibroblasten mit dem CD44-C-Terminus transfiziert, welcher die ERM-Bindedomäne trägt [71, 72, 73]. In einem Pull Down konnte gezeigt werden, dass sowohl der N-Terminus von Wildtyp-Ezrin, als auch der N-Terminus der Mutation R40L an diese Domäne binden kann (Katja Geißler, nicht veröffentlicht).

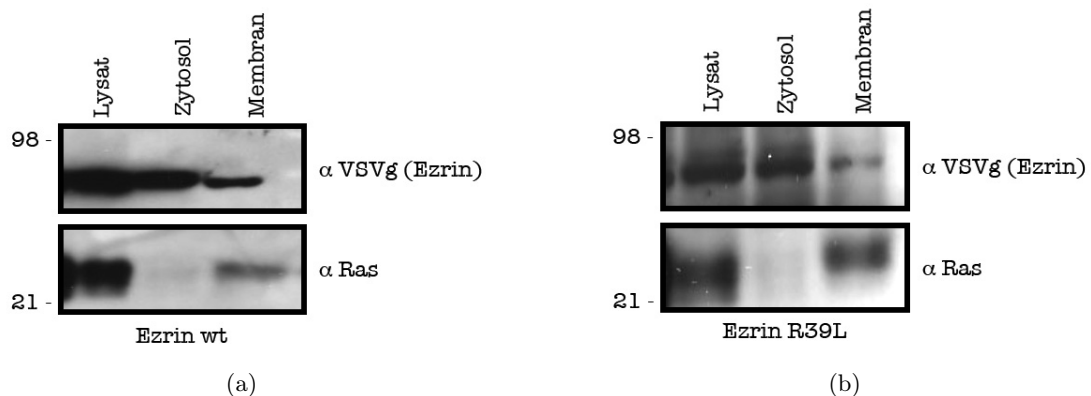


Abbildung 4.9:

- In einer Zellfraktionierung, die Zytosol und Membran voneinander trennt, konnte gezeigt werden, Ezrin, welches stabil in Zellen transfiziert wurde, sowohl in der zytosolischen Fraktion, als auch in den Membranen zu finden ist. Als Kontrolle wurde Ras detektiert, welche hauptsächlich in der Membranfraktion zu finden war.
- Zellen, die mit der Mutante Ezrin R40L stabil transfiziert wurden, zeigten eine vergleichbare Proteinverteilung in der Zelle, wie sie auch in Wildtyp-Ezrin zu finden war. Auch Ras zeigte eine vergleichbare Verteilung. Die Zellen wuchsen unter den gleichen Bedingungen, wie die Wildtyp-Ezrin transfizierten Zellen.

Da sowohl Wildtyp-Ezrin als auch die Mutation R40L die Fähigkeit besaßen, an Ko-Rezeptoren zu binden, sollte mittels Zellfraktionierung die Verteilung in der Zelle aufgezeigt werden. Durch Zentrifugation in spezifischen Puffern (siehe Methodenteil) konnte kein Unterschied in der Lokalisation der Proteine festgestellt werden.

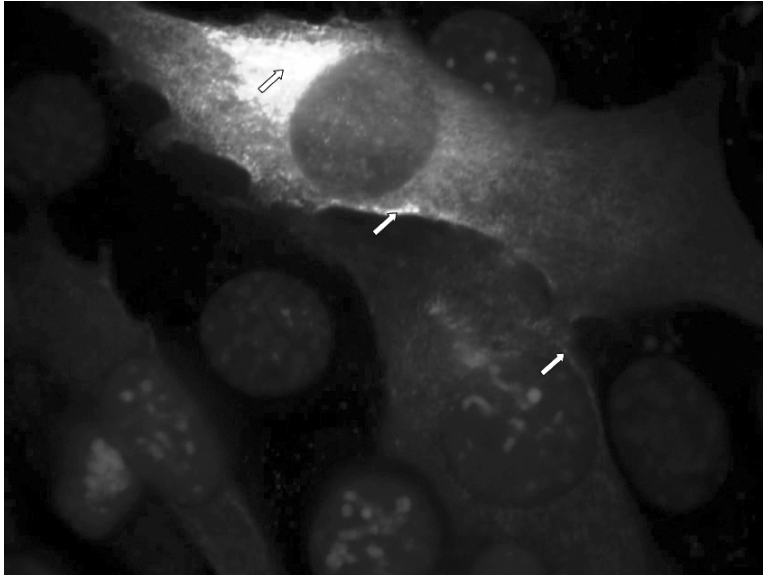


Abbildung 4.10: Mit einem Antikörper gegen die Ezrin-Erkennungssequenz VSV-g und Alexa Fluor 488 konnte Ezrin in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Pfeile). Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI detektiert. Es wurde eine Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet. Zu sehen ist eine 63x Vergrößerung. Die Bilder wurden mit einer CCD Kamera (AxioCam Mrm, Zeiss, Jena) aufgenommen welche mit der AxioVision-Software (Zeiss, Jena) angesteuert wurde.

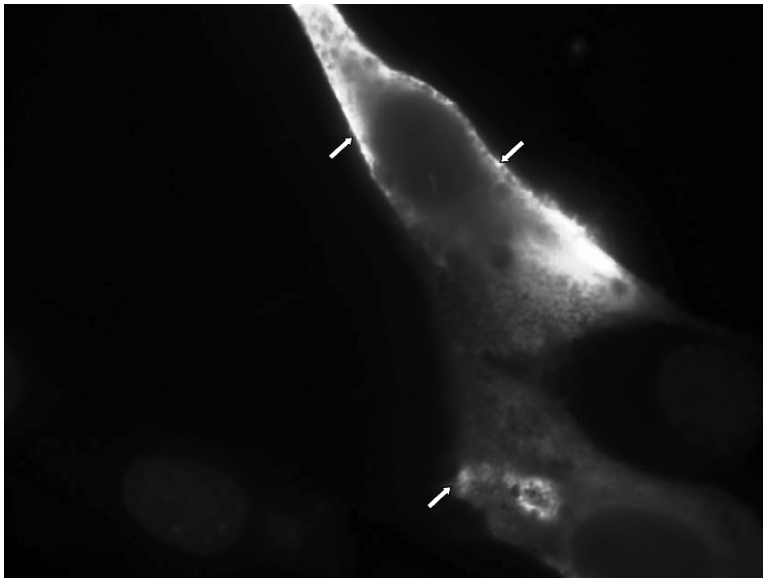


Abbildung 4.11: Auch im Falle der Ras-Binde Mutante Ezrin R40L konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden. Auch hier wurde die Erkennungssequenz von Ezrin (VSV-g) mit Alexa Fluor 488 und DAPI im Zellkern detektiert. Die Pfeile deuten auf die Expression in der Plasmamembran. Die Bilder wurden im selben Verfahren aufgenommen, wie bei Wildtyp-Ezrin beschrieben.

In stabil transfizierten NIH3T3-Zellen wurden Zellen in Vollmedium gezogen und anschließend fraktioniert (Abb 4.9 a & 4.9 b). Sowohl im Falle von Wildtyp Ezrin, als auch bei Ezrin R40L lag ein Teil des Ezrins zusammen mit endogenem Ras in der Membranfraktion vor. Da Ezrin in großen Mengen in den Zellen überexprimiert wurde, ist auch in der zytosolischen Fraktion das Protein zu finden, da nicht die gesamte Proteinmenge

an Ko-Rezeptoren gebunden ist.

Eine Lokalisation von Ezrin (Wildtyp und R40L) an der Plasmamembran konnte auch durch Fluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden (Abb 4.10 & 4.11). Mit primären Antikörper gegen die Erkennungssequenz von Ezrin (VSV-g) und geeigneten Fluorochromen konnte mit den entsprechenden Filtern Ezrin in der Plasmamembran detektiert werden.

4.8 Ezrin R40L vermindert die Aktivierung von Ras

Ein nächster Schritt war es, zu testen, welche Auswirkung die Mutation auf die Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs besitzt. Daher bot es sich an, einen Ras-Aktivierungs-Assay durchzuführen. In diesem Assay wird Raf-RBD eingesetzt, welches an Agarose konjugiert ist. Die so modifizierte Raf-RBD kann nur mit der aktiven Form von Ras (Ras-GTP) binden. Somit kann indirekt die Fähigkeit zur Aktivierung des Signalwegs bestimmt werden.

In dem durchgeführten Ras-Aktivierungs-Assay (Abb 4.12) wurden stabil transfizierte Zelllinien (Wildtyp-Ezrin & Ezrin R40L) verwendet. Die Ezrin-Expression wurde mit Doxycyclin induziert, als Kontrolle dienten zum einen Zellen, die nicht Doxycyclin-induziert waren und somit auch kein Ezrin exprimierten, zum anderen Zellen, die zwar Ezrin exprimierten, aber nicht mit dem Wachstumsfaktor stimuliert wurden.

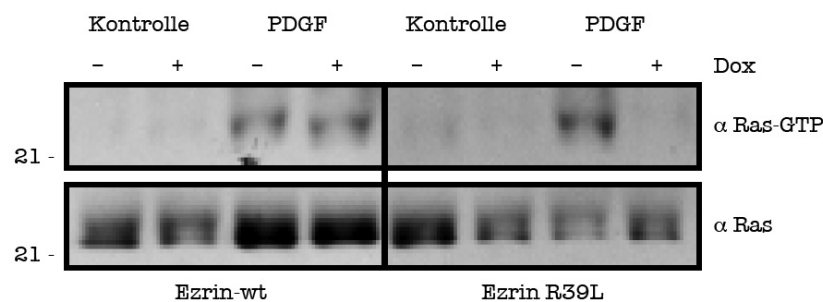


Abbildung 4.12: In einem Ras-Aktivierungs-Assay konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Ezrin-transfizierten Zellen nach Zugabe eines Wachstumsfaktors die Menge an GTP-gebundenen Ras erhöhen. Dies ist nicht der Fall, wenn Ezrin R40L-transfizierte Zellen benutzt werden. Die Transfektion der Ezrin-Konstrukte erfolgte in einem stabilen, Doxycyclin-induzierbaren System.

In beiden Kontrollversuchen, in denen die Zellen nicht mit PDGF stimuliert wurden, konnte kein aktives Ras nachgewiesen werden. Im Falle der Wildtyp-Ezrin exprimierenden Zellen zeigte sich nach PDGF-Stimulation eine Erhöhung der Menge an GTP-Ras, nicht aber im Falle der Ras-Binde-Mutante Ezrin R40L.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Ezrin nach PDGF-Stimulation eine Zunahme an Ras-GTP zeigt und hier der Signalweg aktiviert wurde. Wurde Ezrin R40L exprimiert, wurde die GTP-Bindung an Ras vermindert und der Ras-Signalweg inhibiert.

Ezrin R40L hat in diesem Assay einen dominant negativen Einfluss auf die Aktivierung von Ras. Möglicherweise hat die Bindung an Ko-Rezeptoren einen wesentlichen Einfluss auf diesen Effekt, da auch die mutierte Form von Ezrin (wie beschrieben) immer noch an diese Transmembranproteine binden kann. Durch das Überangebot mutierten Ezrins wird vermutlich endogenes Ezrin verdrängt und eine Ras-Aktivierung kann nicht mehr erfolgen.

4.9 Die Proliferation der Ezrin-Mutante R40L ist vermindert

Da eine Inhibierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs auch Einfluss auf die Proliferation hat, lag es nahe, eine Messung der Proliferationsfähigkeit der stabil transfizierten Zellen durchzuführen. Neben den Wildtyp-Ezrin transfizierten Zellen (NIH3T3) wurden auch die mit der Mutante R40L transfizierten Zellen (NIH3T3) sowohl einer Langzeitmessung über einen Zeitraum von 6 Tagen (nicht gezeigt), als auch einer Kurzzeitmessung mit BrdU (Bromodesoxyuridin) unterzogen. Bei diesem Experiment werden sich teilenden Zellen anstatt Thymidin die Chemikalie BrdU angeboten, die von der Zelle aufgenommen wird. Anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) wird dies während der S-Phase in die DNA eingebaut.

Im Falle der Kurzzeitmessung wurden bei beiden verwendeten Konstrukte ebenfalls das stabil transfizierte System verwendet. Über die Anzahl der Zellen welche BrdU eingelagert hatten (Abb 4.13 a) & 4.13 b)), welches mittels eines Fluoreszenzantikörpers sichtbar gemacht wurde, zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied der beiden getesteten Konstrukte.

Im Falle des Wildtyp-Konstrukts lag die Menge der proliferierenden Zellen bei ungefähr 60 %, im Gegensatz dazu war die Proliferationsfähigkeit der Ezrin R40L transfizierten Zellen auf ungefähr die Hälfte (ca 30 %) gesunken. Dieses Ergebnis korrespondiert mit dem Ergebnis des vorher gezeigten Ras-Aktivierungs-Assays.

4.10 Wildtyp-Ezrin, aber nicht Ezrin R40L, kann an GDP-Ras binden

Durch die Pull Downs, die Proliferations-Assays und den Ras-Aktivierungs-Assay konnte zwar gezeigt werden, dass die Mutante Ezrin R40L zwar nicht mehr an Ras binden kann, die Zellteilungsrate wesentlich vermindert ist sowie der Ras-Signalweg inhibiert wird, allerdings war dadurch nicht die Frage geklärt, welche Art von Ras an Ezrin bindet.

Da die Struktur einer Raf-RBD ähnelt, lag nahe zu vermuten, dass hier ebenfalls – wie bei der Bindung von Ras an Raf – GTP-gebundenes Ras an die Ezrin-FERM-Domäne binden kann. Um diese Frage zu klären wurde GST-Ras Agarose mit Hilfe von

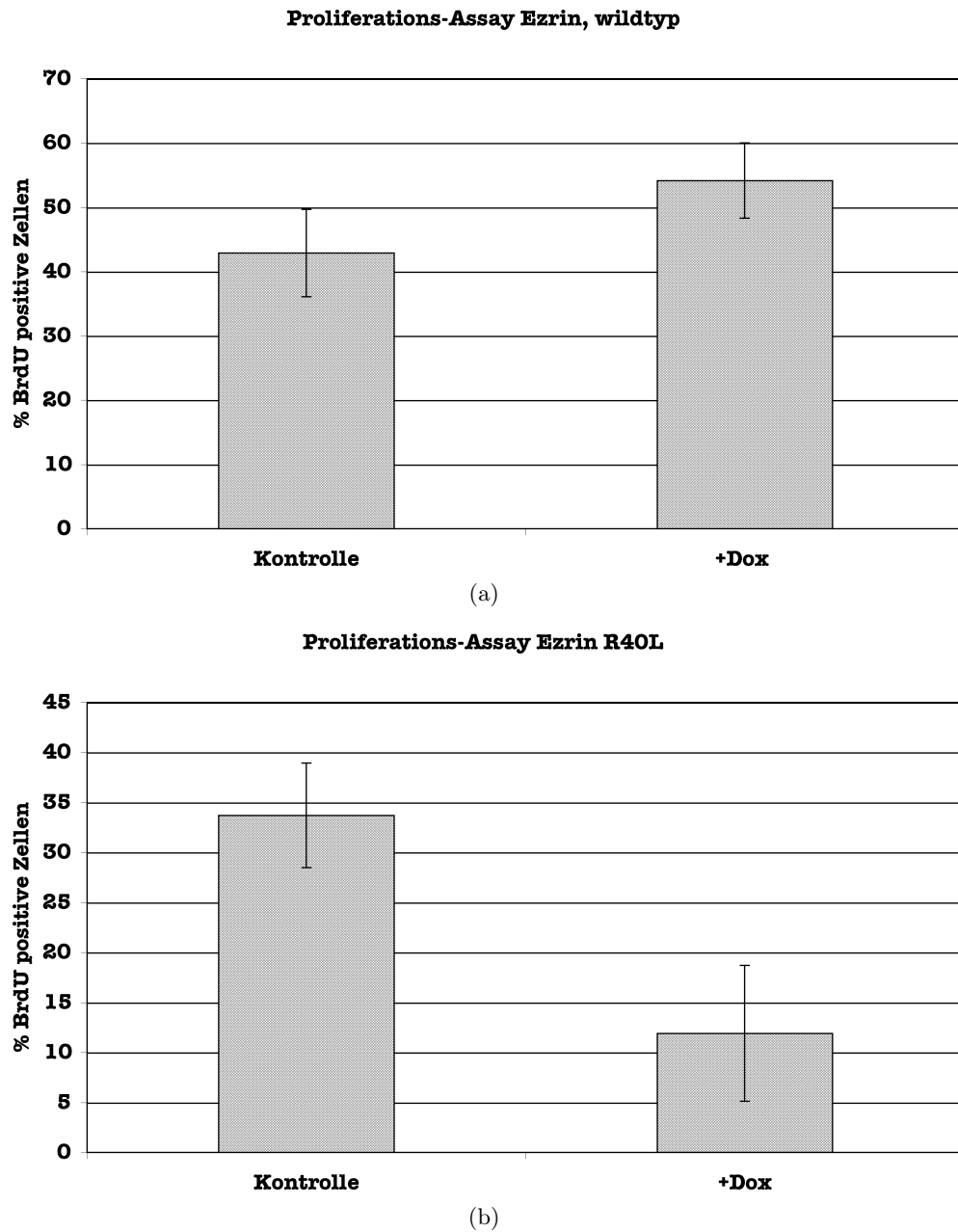


Abbildung 4.13:

a) Wird mittels BrdU-Einlagerung in die DNA die Menge der proliferierenden Zellen ausgewertet, so zeigt sich, dass in Zellen, welche exogenes Wildtyp-Ezrin überexprimieren, keine wesentliche Änderung in der Proliferationsfähigkeit gemessen werden kann. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden mit BrdU inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzantikörper gegen BrdU behandelt um die BrdU-Einlagerung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

b) Wird das gleiche Experiment mit Zellen durchgeführt, welche die Ezrinmutante R40L überexprimieren, zeigte sich eine deutliche Verminderung der BrdU-Einlagerung in diesen Zellen. Die Transfektion der Ezrin-Konstrukte (sowohl Wildtyp-Ezrin, als auch Ezrin R40L) erfolgte in einem stabilen, Doxycyclin-induzierbare System, wie es im Methodenteil beschrieben ist.

spezifischen Puffersystemen entweder mit GDP, oder mit GTP beladen (Abb 4.14). Das so beladene Ras wurde mit Zelllysaten gemischt, welche entweder mit Wildtyp-Ezrin, oder mit Ezrin R40L transfiziert waren. Als Kontrolle für unspezifische Bindung an die Agarose, wurde Glutathion-Agarose verwendet (nicht gezeigt).

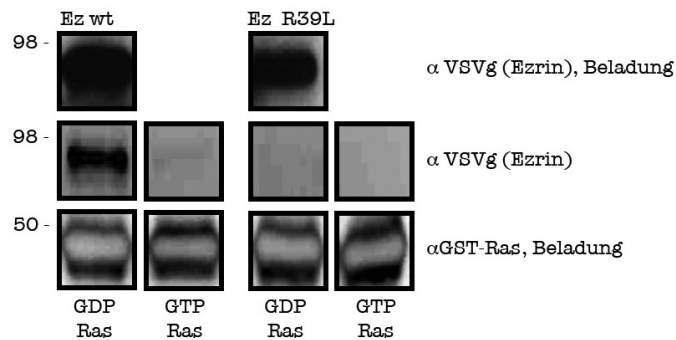


Abbildung 4.14: In einem GST-Ras-Pull Down zeigt Wildtyp-Ezrin eine wesentlich höhere Affinität zu GDP-beladenem Ras, als zu GTP-beladenem Ras. Im Falle der Ras-Binde-Mutante Ezrin R40L ist weder eine Bindung an GDP-Ras, noch an GTP-Ras zu erkennen.

Wurde Ras-GDP bzw. Ras-GTP mit Zelllysatz zusammengebracht, welches Ezrin R40L enthielt, konnte in beiden Fällen keine Bindung nachgewiesen werden. Wurde allerdings Zelllysatz eingesetzt, welches Wildtyp-Ezrin enthielt, konnte nur GDP-gebundenes Ras binden. Bei GTP-Ras konnte wie im Falle der Mutante keine Bindung nachgewiesen werden.

Wird der Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg aktiviert, so ist eine Bindung an GDP-beladenes Ras notwendig. Darüber hinaus spielen auch Ko-Rezeptoren, welche an den Ezrin N-Terminus binden, eine wichtige Rolle. Sie vermitteln die Spezifität der Ras-Aktivierung, in dem sie ERMs und Ras an definierte RTKs bringen.

4.11 Ein Src-Motiv kann für die Myristoylierung (Membranbindung) verwendet werden

Ich habe gezeigt, dass ERM-Proteine für die RTK induzierte Ras-Aktivierung essentiell sind. ERM-Proteine bringen durch direkte Interaktion Ras und SOS in unmittelbare Nähe der aktiven RTK.

Bleibt die Frage, welchen Beitrag RTK leisten? Offenbar muss SOS über Grb2 lokalisiert werden. Was würde geschehen, wenn diese Interaktion zwischen RTK und Grb2/SOS unterbrochen wird? Dazu habe ich folgendes Experiment konstruiert: Wird an Ezrin eine Proteinsequenz angehängt, welche lipidmodifiziert wird, wird dadurch die direkte Membranlokalisation von Ezrin erreicht. Diese Lokalisation wäre unabhängig von RTKs. Wäre dieses lipidmodifizierte Ezrin fähig SOS und Ras zu aktivieren?

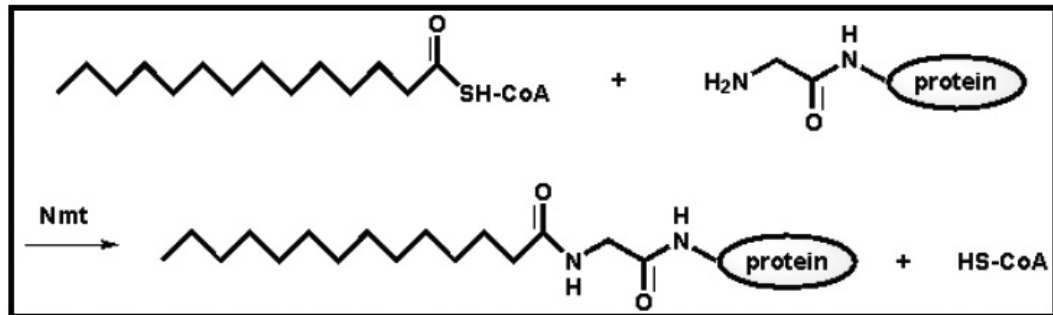


Abbildung 4.15: Durch Myristoylierung wird erreicht, dass sich Proteine in der Plasmamembran einlagern. Durch den Transfer eines Myristat-Restes (C14) von Myristoyl-Co-Enzym A an einen N-terminalen Glycin-Rest eines Proteins, wird dieses irreversibel verändert.

Um Proteine direkt an die Membran zu binden, gibt es die Möglichkeit einer Lipidmodifikation über ein Myristoylierungsmotiv. Ein solches Motiv liegt bei vielen Proteinen vor und ermöglicht über Myristoylierung zur Membranbindung. Ein Beispiel sind Mitglieder der Src-Kinase Familie. Experimentell wurde ein solches Motiv beispielsweise für SOS eingesetzt, was auch hier zur Lokalisierung in die Plasmamembran führte [35].

Bei dieser Art der Lipidmodifikation bindet ein C14 lange Fettsäurerest irreversibel an einen Glycin-Rest (Abb 4.15), was zur direkten Membranbindung führt. In diesem Prozess wird Myristinsäure irreversibel an ein N-terminales Glycin durch die sogenannte N-Myristoyltransferase gekoppelt.

4.12 Die Lipidmodifizierung von Ezrin hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ezrin in der Membran

Um Ezrin an die Plasmamembran zu bringen, wurden Fusionsproteine hergestellt, welche aus dem Src-Motiv und Ezrin bestanden. Zunächst wurde diese Lipidmodifikation an Wildtyp-Ezrin durchgeführt (Src-Ezrin). Um zu testen, ob auch dieses Ezrin-Protein im richtigen Kompartiment zu finden ist, wurde auch hier eine Zellfraktionierung durchgeführt (Abb 4.16). Wie schon zuvor beschrieben, wurde auch hier Zytosol von der Membranfraktion getrennt und neben Ezrin auch Aktin und Ras nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass Src-Ezrin hauptsächlich in der Membranfraktion zu finden war. Da durch die Modifikation Ezrin an die Membran bindet, konnte hier weit weniger Protein in der zytosolischen Fraktion nachgewiesen werden, als dies bei nicht-modifiziertem Ezrin der Fall war.

Auch mittels Fluoreszenz-Mikroskopie konnte eine Lokalisation von myristoyliertem Ezrin in der Plasmamembran gezeigt werden (Abb 4.17).

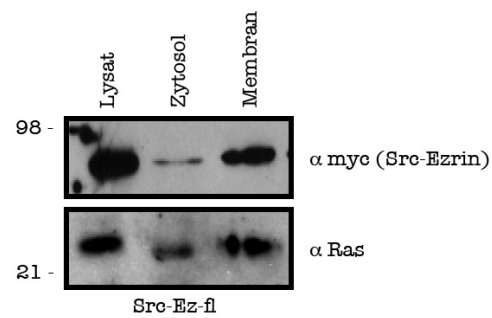


Abbildung 4.16: In einer Zellfraktionierung von Zellen, die mit lipidmodifiziertem Ezrin transfiziert wurden, zeigte sich, dass Src-Ezrin zum größten Teil in der Membranfraktion lokalisiert ist.

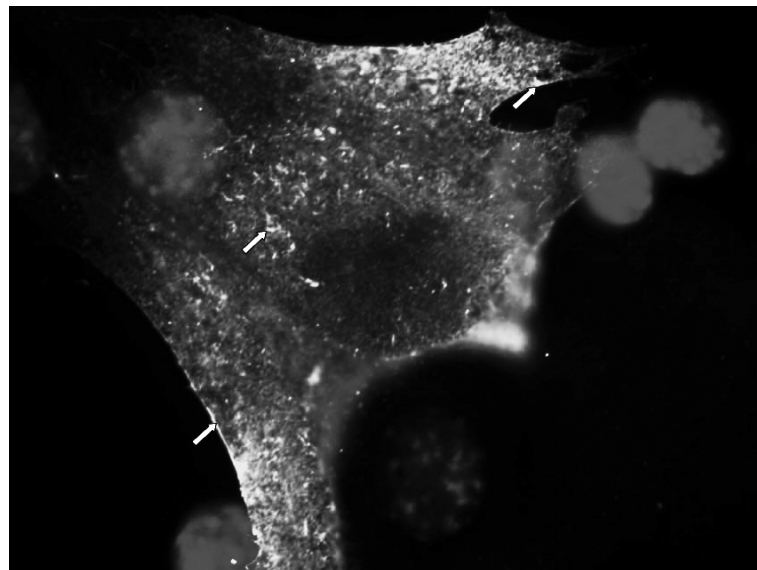


Abbildung 4.17: Mit einem Antikörper gegen die Ezrin-Erkennungssequenz myc und Alexa Fluor 488 konnte Ezrin in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Pfeile). Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI detektiert.

4.13 Membrangebundenes Wildtyp-Ezrin aktiviert den Ras/MAP-Kinase Signalweg auch ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren

Um erste Ergebnisse hinsichtlich der Aktivierung des Ras-Signalwegs zu erhalten, wurde zunächst ein Reporter-Assay durchgeführt. In diesem Versuch wurden entweder Wildtyp-Ezrin oder Src-Ezrin zusammen mit dem Transaktivierungsvektor und dem Reportervektor transient in Mausfibroblasten transfiziert. Würde Ezrin den Ras-Signalweg aktivieren, so würde dies zunächst die Phosphorylierung von Erk zur Folge haben. Phosphoryliertes Erk kann in den Nukleus wandern und dort weitere Proteine phosphorylieren, beispielsweise Elk1. Elk1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Signalkaskade, die nach der Stimulierung durch Wachstumsfaktoren aktiviert wurde, schließlich auf den c-Fos Promoter übertragen kann [122].

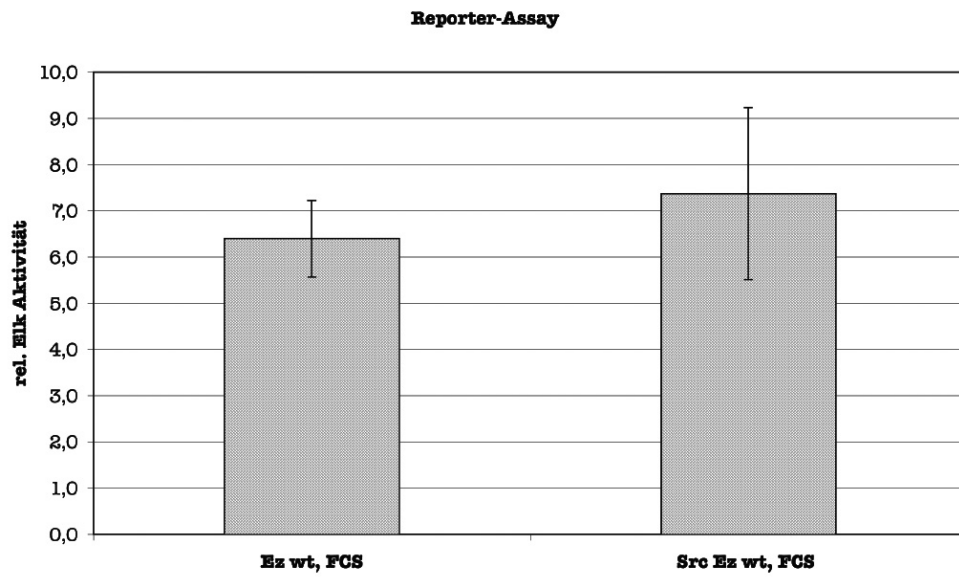
Über den Transaktivierungsvektor wird die Produktion eines Elk1/Gal4-Fusionsprotein reguliert, welches durch den aktiven Signalweg ebenfalls phosphoryliert werden würde. Das phosphorylierte Elk1/Gal4-Fusionsprotein kann an den Gal4-Promotor des Reportervektors binden, welcher daraufhin Firefly-Luziferase produziert. Durch eine chemische Reaktion entsteht zusammen mit Luziferin eine Lumineszenz, die gemessen werden kann.

Die ersten Messungen wurden mit Zellen durchgeführt, die in Vollmedium gewachsen waren (Abb 4.18 a). Für beide Ezrin-Konstrukte konnte eine vergleichbare Chemielumineszenz gezeigt werden.

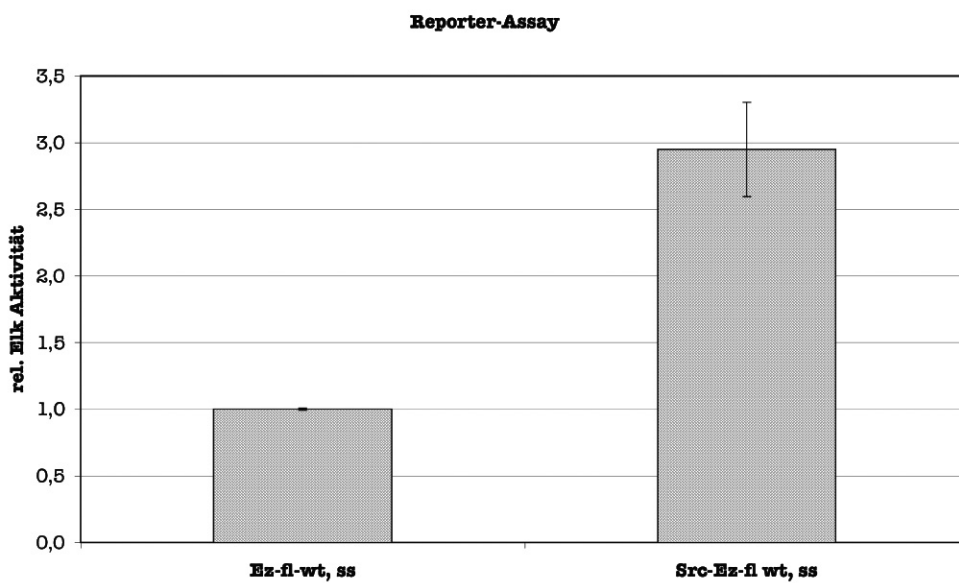
Wurden die transfizierten Zellen im gleichen Versuchsaufbau dagegen über Nacht in Hungermedium gehalten (Abb 4.18 b), dann zeigte sich, dass nur im Falle des membrangebundenen Ezrin eine Aktivierung stattfand.

Aus diesem Experiment ergab sich die Folgerung, dass in Hungermedium die Aktivität endogener ERM-Proteine abgeschaltet ist und nur wenn Wachstumsfaktoren (wie in Vollmedium vorhanden) verfügbar sind, eine Aktivierung erfolgt. Eine weitere Schlussfolgerung aus diesem Versuch war, dass eine direkte Membran-Bindung offensichtlich genügte, um den Ras-MAP-Kinase Signalweg zu aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt damit auch ohne die Wachstumsfaktor-stimulierte Aktivierung von RTKs.

Die Ergebnisse wurden auf Wildtyp-Ezrin in Hungermedium abgeglichen.



(a)



(b)

Abbildung 4.18:

a) In einem Reporter-Assay konnte gezeigt werden, dass sowohl membrangebundenes Ezrin, als auch Wildtyp-Ezrin zur Aktivierung des Signalwegs führt. In diesem Versuch wurden die Zellen in Normalmedium gezogen. Die Messung der Lumineszenz erfolgte im BertholdTech Mithras welcher mittels MicroWin 2000 angesteuert wird.

b) Wird das gleiche Experiment mit Zellen durchgeführt, welche über Nacht in Hungermedium inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass nur membrangebundenes Ezrin zur Aktivierung des Signalwegs führt. Die Werte wurden auf Wildtyp-Ezrin exprimierende Zellen abgeglichen, welche über Nacht in Hungermedium inkubiert wurden und sind somit in Relation zu diesem Wert zu sehen.

4.14 Src-Ezrin aktiviert trotz fehlender Wachstumsfaktoren die Bildung von Ras-GTP

Um zu überprüfen, ob sich die Resultate aus den Luziferase-Assays auch in einem Ras-Aktivierungs-Assay bestätigen ließen (Abb 4.19), wurden Mausfibroblasten entweder mit Wildtyp-Ezrin oder mit lipidmodifiziertem Src-Ezrin transient transfiziert. Um eine bessere Aussage über die Aktivierung von Ras machen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Ras transfiziert, welche eine myc-Erkennungssequenz trug. Die Zellen wurden danach entweder in Vollmedium gezogen, um die Ras-Aktivierungslevel im normalen Wachstum festzustellen, oder das Medium wurde über Nacht gegen Hungermedium ausgetauscht.

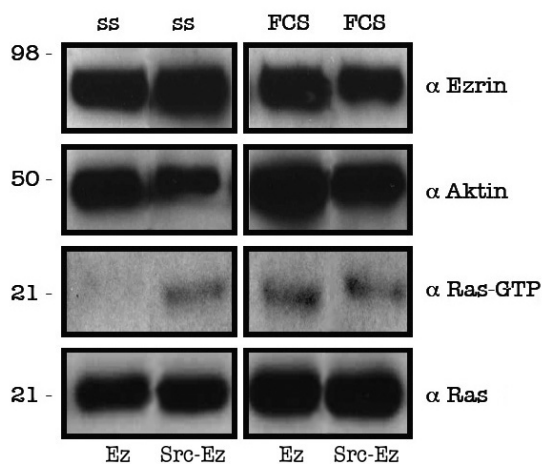


Abbildung 4.19: In einem Ras-Aktivierungs-Assay konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Ezrin-transfizierten Zellen nur im Vollmedium die Menge an GTP-beladenem Ras erhöhen. Im Falle von Src-Ezrin ist dies schon in Hungermedium möglich.

Wurden Wildtyp-Ezrin-transfizierte Zellen in Hungermedium gezogen, so konnte kein aktives Ras detektiert werden, dies war nur in Vollmedium möglich. Bei den Src-Ezrin-transfizierten Zellen war die Detektion von GTP-Ras schon im Hungermedium möglich.

Durch diesen Versuch konnten die Ergebnisse der Luziferase-Assays bestätigt werden.

Lipidmodifiziertes Ezrin kann von sich aus, ohne RTK Stimulation, Ras-Aktivierung verursachen. Da Ras-GTP die Proliferation treibt, war meine nächste Frage: Erhöht lipidmodifiziertes Ezrin ohne weitere Stimuli die Proliferation und ist dies onkogen, wie beispielsweise onkogenes, mutiertes Ras?

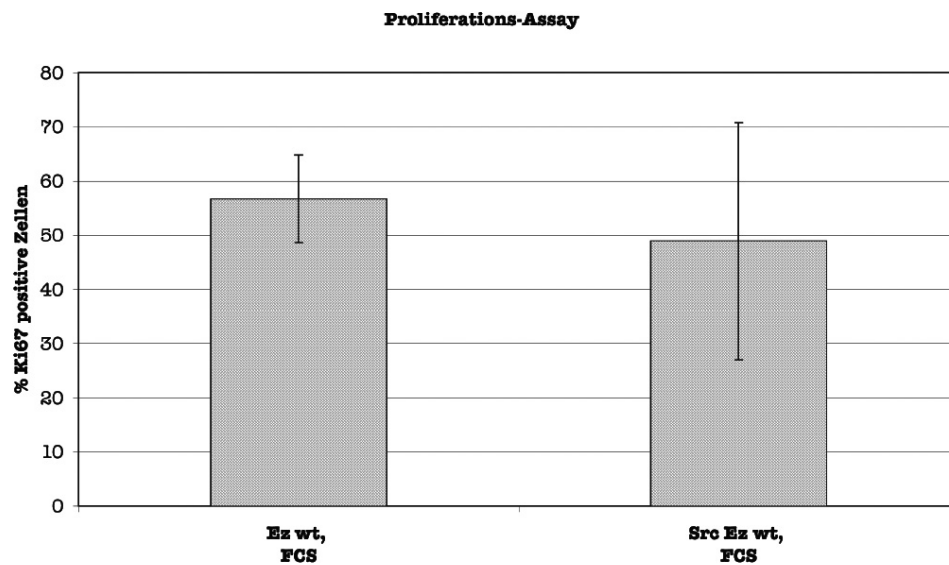
4.15 Die Proliferation von Src-Ezrin exprimierenden Zellen ist in Hungermedium erhöht

Für die Messung der Proliferation wurden, wie zuvor im Reporter-Assay, transient transfizierte Zellen verwendet, bei denen die Teilungsrate entweder in Vollmedium oder in Hungermedium gemessen wurde.

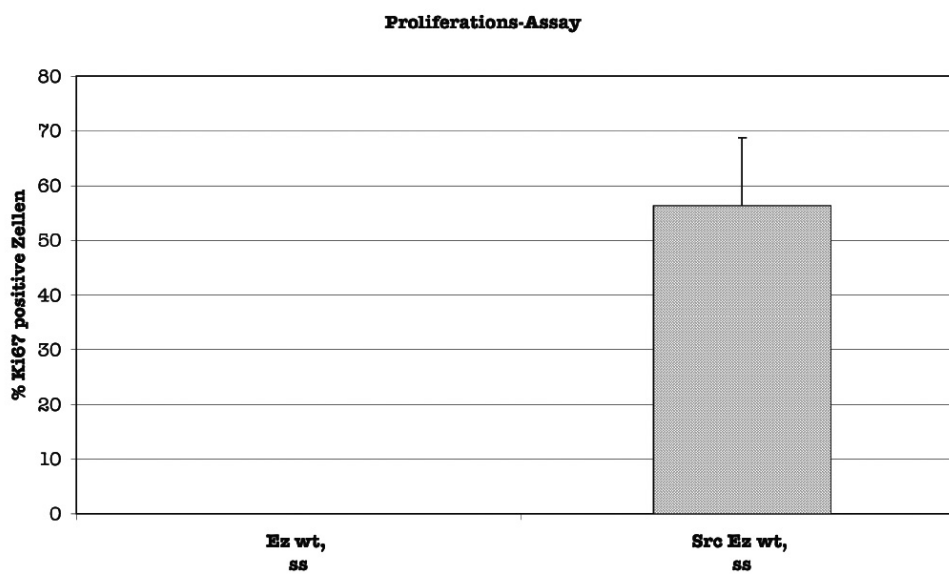
Das Experiment wurde hier mit dem Proliferationsmarker KI67 durchgeführt, welches hauptsächlich in der S-, G2- und in der M-Phase exprimiert wird, nicht aber in nicht-proliferierenden Zellen nachweisbar ist [123, 124].

Wie zuvor im Reporter-Assay konnte auch hier kein wesentlicher Unterschied der Proliferation gemessen werden, wenn die transfizierten Zellen in Vollmedium (Abb 4.20 a) gezogen wurden. Wenn allerdings das Medium über Nacht gegen Hungermedium ausgetauscht wurde, kam es zu einem deutlichen Rückgang der Proliferation der Wildtyp-Ezrin transfizierten Zellen, während sich die Src-Ezrin transfizierten Mausfibroblasten noch immer ein auf dem vorherigen Niveau teilten (Abb 4.20 b).

Es wurde in den vorherigen Versuchen schon gezeigt, dass sich Wildtyp-Ezrin positiv auf die Aktivierung des Ras-Signalwegs auswirkt, was in einem Ras-Aktivierungs-Assay gemessen werden kann, der es erlaubt, die Menge an GTP-beladenem Ras zu detektieren. Src-Ezrin dagegen beeinflusste bereits ohne Wachstumsfaktoren die Proliferation positiv. Ob sich ein vergleichbares Ergebnis auch auf Ebene der Ras-Aktivierung feststellen lies, war Gegenstand des nächsten Experiments.



(a)



(b)

Abbildung 4.20:

- a) In einer Messung der Proliferation zeigte sich kein wesentlicher Unterschied der Proliferation zwischen nicht-lipidmodifiziertem Ezrin und lipidmodifiziertem Ezrin, wenn die Zellen in Vollmedium wuchsen.
- b) Wurde die Messung mit in Hungermedium inkubierten Zellen durchgeführt, zeigte sich eine deutliche Erhöhung der proliferierenden Zellen im Falle der Src-Ezrin transfizierten Zellen.

4.16 In Src-Ezrin transfizierten Zellen hat ein reduziertes Level an Integrin β -1 keinen Einfluss auf die Aktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs

Wie in 4.2 und 4.3 gezeigt, konnte Integrin β -1 als Ko-Rezeptor von PDGF-R isoliert werden. Ein Integrin β -1 Knock Down führte zur verminderten Antwort im Signalweg. Es stellte sich nun die Frage, ob Src-Ezrin diese verminderte Antwort blockieren könnte. Dazu wurde ein Knock Down Experiment mit anschließendem Ras-Aktivierungs-Assay durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit Wildtyp-Ezrin (Abb 4.21 a) oder mit Src-Ezrin (Abb 4.21 b) transient transfiziert.

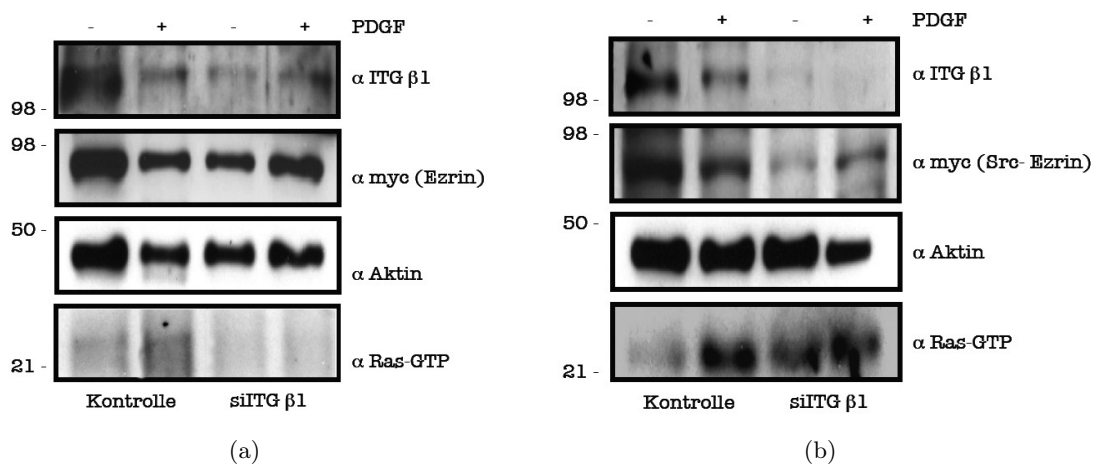


Abbildung 4.21: Der Ko-Rezeptor Integrin β -1 wurde mit Hilfe von spezifischer siRNA reduziert. Zusätzlich wurden die Zellen entweder mit Ezrin (a), oder mit Src-Ezrin (b) transfiziert. Nach Stimulation der Zellen mit dem Wachstumsfaktor PDGF konnte im Falle der Ezrin-transfizierten Zellen keine Aktivierung des Ras-Signalwegs nach dem Integrin β -1 Knock Down gezeigt werden. Dagegen konnte in den Zellen, welche mit Src-Ezrin transfiziert wurden, trotz Verminderns des Ko-Rezeptors Integrin β -1 eine Aktivierung des Ras-Signalwegs detektiert werden.

Der Integrin β -1 Knock Down in Zellen, welche mit Wildtyp-Ezrin transfiziert wurden, zeigte ein vergleichbares Bild wie es sich auch in den nicht transfizierten Zellen darstellte. Nur wenn Integrin β -1 nicht reduziert wurde, erfolgte nach der Stimulation mit PDGF auch eine Aktivierung, das heißt eine Zunahme des GTP-beladenen Ras-Proteins.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Src-Ezrin transfizierten Zellen ein anderes Bild. Hier erfolgte auch nach dem Knock Down von Integrin β -1 eine Aktivierung von Ras, welche zusätzlich auch unabhängig vom Wachstumsfaktor PDGF war.

Wenn ERM-Proteine nicht direkt in der Membran lokalisiert sind, ist die Bindung der FERM-Domäne an Ko-Rezeptoren und an GDP-Ras ist entscheidend für die RTK Stimulation und die Ras-Aktivierung.

Ist Ezrin dagegen direkt in der Membran lokalisiert (Src-Ezrin), dann resultiert daraus

eine spontane Aktivierung des Ras-Signalwegs, ohne dass dieser mit Wachstumsfaktoren stimuliert werden muss. Ob in dieser Form eine Anbindung an GDP-Ras oder etwa an Ko-Rezeptoren wie CD44 oder Integrin β -1 erfolgen kann, musste noch geklärt werden. Ein erster Schritt dies zu untersuchen, war, in membrangebundenem Ezrin die N-terminale FERM-Domäne zu entfernen (Src-Ezrin α h/ct), so dass nur noch der mittlere α helikale und der C-terminale Teil vorhanden war und zu fragen, ob auch hier eine Aktivierung der Ras-Signalwegs stattfinden kann. Das Ezrin-Protein wurde so konstruiert, dass genau wie bei dem nicht verkürzten Protein, eine direkte Membranbindung möglich war.

4.17 Das Fehlen der FERM-Domäne hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von Src-Ezrin α h/ct

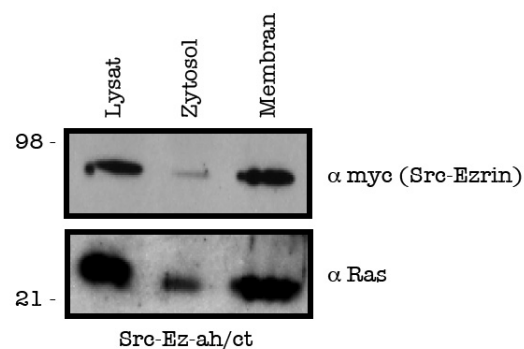


Abbildung 4.22: In einer Zellfraktionierung konnte gezeigt werden, dass Src-Ezrin α h/ct in der Membranfraktion zu finden ist.

Um sicher zu stellen, dass auch das um die FERM-Domäne verkürzte Ezrin in den richtigen Kompartimenten lokalisiert war, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt (Abb 4.22). Auch für diesen Versuch wurden die stabil-transfizierten Zellen verwendet.

In der Zellfraktionierung wurde die zytosolische Fraktion von der Membran-Fraktion durch Zentrifugation und spezifische Puffer getrennt und in einem SDS-Gel aufgeschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass Src-Ezrin α h/ct vorwiegend in der Membran-Fraktion zu finden war und nur ein geringer Teil im Zytosol, woraus sich schließen ließ, dass die Membran-Bindung auch im verkürzten Protein funktioniert. In dieser Fraktion ließ sich auch der Hauptanteil von Ras nachweisen. Ein vergleichbares Bild zeigte sich in der Fluoreszenz-Mikroskopie (Abb 4.23). Hier wurde die Erkennungssequenz von Src-Ezrin α h/ct (VSV-g) mit Hilfe von Alexa Fluor 488 sichtbar gemacht. In diesem Versuch wurden die Zellen transient transfiziert.

Nachdem sichergestellt war, dass auch ein verkürztes Ezrin die Fähigkeit besaß, direkt an die Plasmamembran zu binden, stellte sich zunächst die Frage, ob auch hier

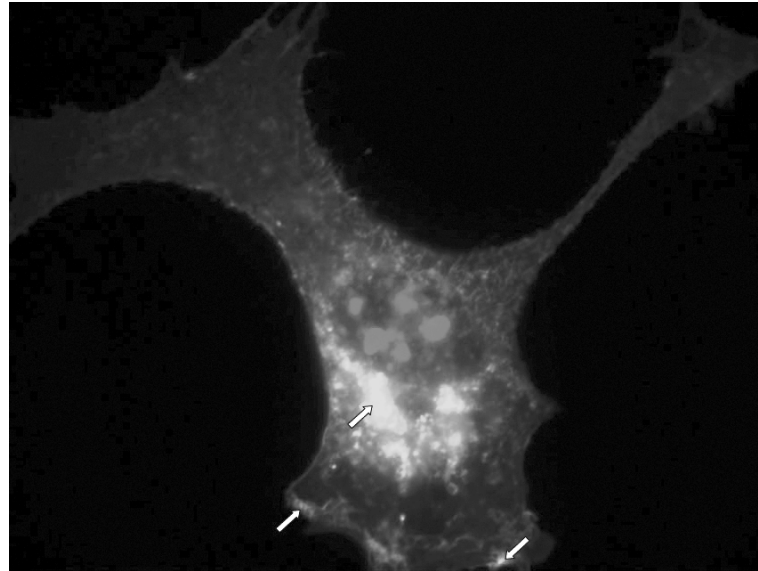


Abbildung 4.23: Mit einem Antikörper gegen die Ezrin-Erkennungssequenz VSV-g und Alexa Fluor 488 konnte Ezrin in transient transfizierten Zellen (NIH3T3) in der Plasmamembran nachgewiesen werden (Pfeile). Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI detektiert.

die fehlende Bindestelle für GDP-Ras einen dominant negativen Einfluss auf die Ras-Aktivierung besaß, wie dies schon zuvor im Falle der Ras-Binde-Mutante Ezrin R40L gezeigt werden konnte.

4.18 Src-Ezrin $\alpha h/ct$ inhibiert die Bildung von GTP-Ras

Auch in diesem Experiment wurden verschiedene Konditionen getestet. Neben Zellen, welche in Vollmedium wuchsen, wurden auch Zellen getestet, welche in Hungermedium wuchsen beziehungsweise in Hungermedium in welchem die Zellen mit PDGF stimuliert wurden getestet (Abb 4.24). Als Kontrolle dienten nicht-Doxycyclin-induzierte Zellen, welche aufgrund dessen kein Src-Ezrin $\alpha h/ct$ exprimierten.

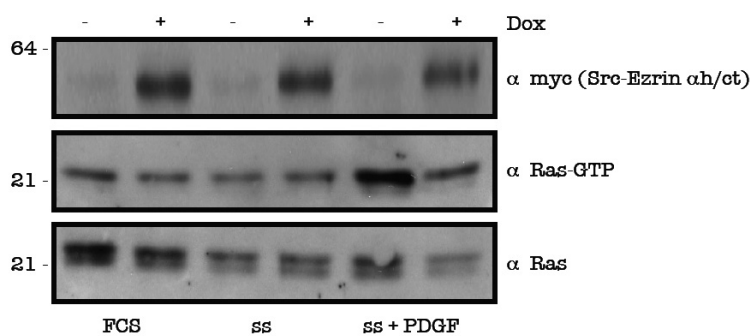


Abbildung 4.24: In In einem Ras-Aktivierungs-Assay konnte gezeigt werden, dass die Src-Ezrin $\alpha h/ct$ -transfizierten Zellen auch nach Stimulation mit PDGF die Menge an GTP-gebundenem Ras nicht erhöhen könnten, wie dies bei Wildtyp-Ezrin der Fall ist.

Bei den Zellen die in Vollmedium, beziehungsweise in Hungermedium gezogen wurden,

konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den Doxycyclin-induzierten Zellen in Bezug auf aktives Ras festgestellt werden.

Allerdings zeigte sich bei Zellen die nicht Doxycyclin-induziert waren nach der Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF eine Erhöhung der GTP-Ras-Menge, dies war bei den Src-Ezrin $\alpha h/ct$ -transfizierten Zellen nicht der Fall. Damit konnte gezeigt werden, dass auch hier ein dominant negativer Effekt aufgetreten war. Ob sich dieser Effekt auch in einem Proliferations-Assay zeigen würde, sollte mit dem nächsten Versuch geklärt werden.

4.19 Zellen, welche exogenes Src-Ezrin $\alpha h/ct$ überexprimieren, besitzen eine verminderte Teilungsfähigkeit

Für den Proliferations-Assay, welcher mit BrdU durchgeführt wurde, wurden Mausfibroblasten mit dem verkürzten, membranbindenden Ezrin-Konstrukt stabil transfiziert und mit Doxycyclin induziert. Die transfizierten Zellen wurden 4 Stunden mit BrdU bei 37°C inkubiert. BrdU wurde mit einem geeigneten Fluoreszenzantikörper sichtbar gemacht. Die Src-Ezrin $\alpha h/ct$ -transfizierten Zellen mit BrdU-Einlagerung wurden gezählt und gegen nicht-induzierte Zellen abgeglichen.

Es zeigte sich, dass Src-Ezrin $\alpha h/ct$ -transfizierte Zellen im Gegensatz zu Src-Ezrin in der ungekürzten Form eine stark verminderte Einlagerung an BrdU aufwiesen und dies obwohl die Zellen in Vollmedium inkubiert wurden.

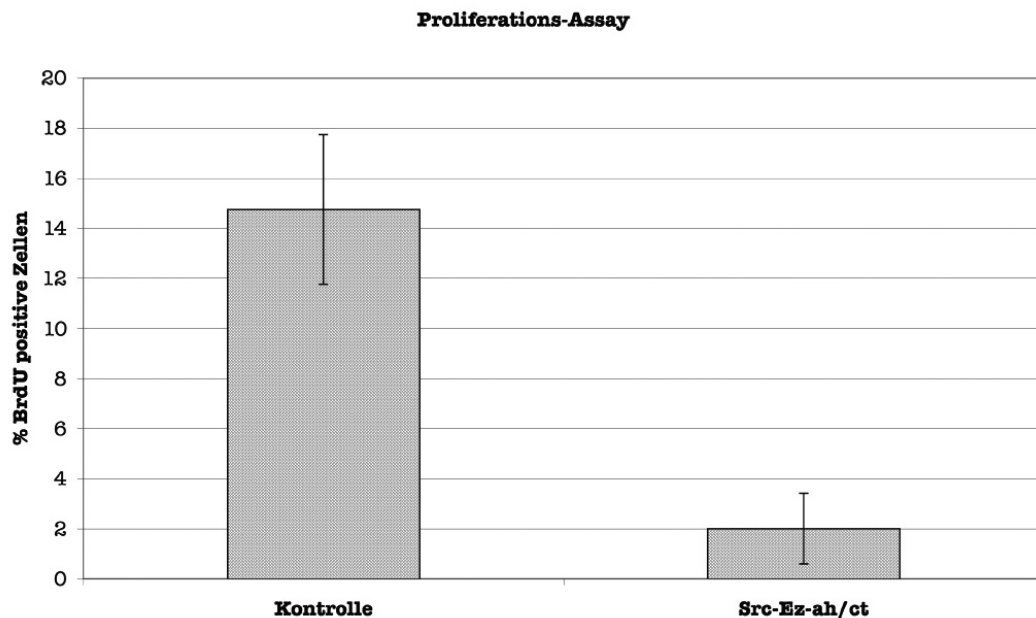


Abbildung 4.25: In einem BrdU-Assay konnte gezeigt werden, dass Src-Ezrin $\alpha h/ct$ -transfizierte Zellen eine verminderte Teilungsfähigkeit besitzt.

Offensichtlich spielt die FERM-Domäne auch in membrangebundenem Ezrin eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs. Ob dies nun lediglich auf die fehlende GDP-Ras-Bindung an Ezrin zurückzuführen war, oder ob auch andere Faktoren Einfluss auf diesen dominant negativen Effekt haben, konnte durch diesen Versuch allerdings nicht geklärt werden. Dafür wäre es notwendig beispielsweise auch mit Src-Ezrin R40L verschiedene Experimente durchzuführen.

5 Diskussion

5.1 ERM-Proteine und deren Bindung an Ko-Rezeptoren sind wichtige Komponenten in der Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs

Um eine Aktivierung des Ras-MAP-Kinase Signalwegs zu erreichen, müssen verschiedene Voraussetzungen gegeben sein. Zunächst muss eine Stimulierung durch Wachstumsfaktoren erfolgen, welche an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden. Erst dadurch ist es möglich, dass ein Komplex aus SOS und Grb 2 an phosphoryliertes Tyrosin bindet. Erst jetzt kann SOS als GEF aktiv werden [34]. SOS und GDP-beladenes Ras bilden dann einen Komplex, in dem GDP durch GTP ersetzt wird [37, 40].

Um den Ras-Signalweg zu aktivieren, müssen aber auch andere Voraussetzungen gegeben sein, beispielsweise konnte Ko-Rezeptoren als weitere Komponente in diesen Komplexen nachgewiesen werden. Diese Ko-Rezeptoren scheinen spezifisch für die jeweiligen RTKs zu sein [74] und haben unter anderem die Aufgabe, Wachstumsfaktoren an RTKs zu konzentrieren und zu präsentieren [64, 62, 63]. Im Falle des PDGF-Rezeptors konnte zwar schon gezeigt werden, dass Integrin α -3 β -1 als Ko-Faktor für die RTK-abhängige Migration bestimmt werden konnte [120], aber bisher wurde noch nicht nachgewiesen, ob Integrin β -1 in der Aktivierung des Ras/MAP-Kinase Signalwegs über die Bindung an ERM-Proteine beteiligt ist.

In dieser Arbeit konnte durch Immunopräzipitationsversuchen gezeigt werden, dass ERMs zusammen mit Integrin β -1, PDGFR, SOS und Ras in einem Komplex vorliegen. Durch Knock Down Experimente gelang es, die Proteinmenge von Integrin β -1 über das Blockieren der RNA zu vermindern. Es zeigte sich, dass nach PDGF-Stimulation keine Erhöhung der Ras-Aktivierung zu verzeichnen war. In den Versuchen wurde nur die β -Untereinheit inhibiert und somit die Funktion des Gesamtproteins zerstört, was impliziert, dass die Bindung von ERM-Proteinen an der β -Untereinheit erfolgt, zumal hier auch eine FERM-Bindedomäne beschrieben wurden, an die Talin - ein weiteres Mitglied der Band 4.1 Proteine - binden kann [125].

Integrine sind - wie CD44 - membranständige Glycoproteine und spielen als Vermittler der Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsion eine wichtige Rolle [126, 127, 128]. Im Gegensatz zu CD44 sind Integrine aber Heterodimere, welche aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Bisher sind 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Einheiten bekannt, wobei die Untereinheiten nicht-kovalent miteinander verknüpft sind. Die α -Untereinheit besitzt nur eine Disulfidbrücke, dagegen ist die β -Kette besonders reich

an Cysteinresten. Beide Untereinheiten haben relativ kurze zytoplasmatische Domänen [129].

In den hier durchgeführten Versuchen wurden, wie schon beschrieben, nur die β -Untereinheit inhibiert und es lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sagen, welches im Falle des PDGF-stimulierten Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs die passende α -Untereinheit ist. Allerdings kann man aufgrund der Phänotypen der Knock Out Mäusen Hinweise finden. So zeigte sich in Knock Out Studien, dass PDGF/PDGF-R in die Gefäßbildung involviert ist [130, 131, 132]. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Mäusen die einen Integrin α -5^{-/-} Hintergrund haben [133]. Um hier aber ein aussagekräftiges Bild zu bekommen, müssten diesen ersten Hinweise eine gezieltere Suche folgen.

Die Vielzahl der Untereinheiten ermöglicht eine hohe Variabilität von Signalmöglichkeiten (Abb 5.1), daher spielen Integrine die verschiedensten Rollen in der Zelle. Sie haben Einfluss auf die Entwicklung der Zelle, auf die Organisation des Zytoskeletts, auf die Transkriptionskontrolle, auf die Proliferation, die Migration, die Immunantwort oder auch auf die Entstehung von Krebs [134].

Signale können durch die Integrine in beiden Richtungen der Zellmembran gegeben werden, zum einen durch das so genannte "Inside-Out-Signaling", bei dem die Antwort auf Aktivierungssignale der Zelle die Änderung der Tertiär- und Quartärstruktur der extrazellulären Region zur Folge hat. Zum anderen über das "Outside-In-Signaling", bei welchem die Bindung von Liganden eine strukturelle Neuordnung der extrazellulären Region auslöst und damit Signale ins Zellinnere leitet. Es können auch Integrincluster durch die Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix entstehen, was zur Folge hat, dass auf der zytoplasmatischen Seite dadurch Aktinfasern aufgebaut werden, diese wiederum können sich dadurch zu größeren Fasern verstärken (positives feedback).

Auch im Falle der PDGF-stimulierten, Integrin β -1-abhängigen Aktivierung des Ras/-MAP-Kinase Signalwegs kann man von einem "Outside-In-Signaling" ausgehen. Die Interaktion mit dem PDGF-Rezeptors resultiert hier in der Bindung an ERM/Ezrin. Vergleicht man hier wieder mit CD44, so lässt sich feststellen, dass im Falle von CD44 die Bindung vom ERM an den zytoplasmatischen Teil durch Phosphorylierung am CD44-C-Terminus reguliert wird. Auch bei Integrin β -1 findet sich eine solche Sequenz. Hier erfolgt die Phosphorylierung der Untereinheit am NPxY/F-Motiv, was möglicherweise die Interaktion mit anderen Proteinen reguliert [135]. ERM-Proteine wären ein Kandidat für eine solche Regulation.

Ob im Gegenzug auch ein "Inside-Out-Signaling" erfolgt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, aber nicht ausschließen. Durch die Bindung von ERMs am zytoplasmatischen Teil von Integrin β -1 wäre es möglich, dass eine Konformationsänderung des extrazellulären Teil erfolgt und somit die Ko-Rezeptor-Funktion reguliert wird. Dies wiederum hätte Auswirkungen auf die Ligandenbindung an den N-terminalen Teil von Integrin β -

1, welcher für die Präsentation von Wachstumsfaktoren an RTKs wichtig sind.

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass eine Exklusivität der ERM-Proteine mit nur einem Wachstumsfaktor/RTK auszuschließen ist. RTK/ERM-Komplexe kommen sowohl in RT4-Zellen im Falle von PDGF-R und ERM zu finden sind, als auch in NIH3T3-Zellen im Falle von c-Met und ERM [74]. Allerdings liegt es Nahe, dass die Interaktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Ko-Rezeptoren spezifisch sind. Dies konnte sowohl an CD44v6/c-Met, als nun auch an Integrin β -1/PDGFR gezeigt werden.

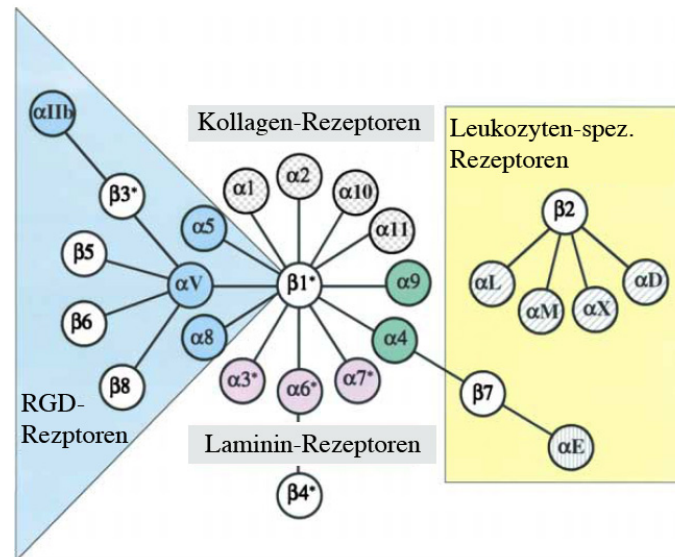


Abbildung 5.1: Übersicht der Integrin-Rezeptoren Familie (nach Hynes, 2002). Die verschiedenen α - und β -Untereinheiten können miteinander zu Heterodimeren verknüpft werden. Dadurch wird eine Vielzahl verschiedener Signalmöglichkeiten erlaubt.

5.2 Die direkte Bindung von GDP-Ras an den Ezrin ist essentiell für die Aktivierung von Ras

Ezrin hat, wie alle ERMs, einen 3-teiligen Aufbau der N-terminalen FERM-Domäne [93, 94, 95]. Es stellte sich heraus, dass ein Teil dieser Domäne eine Struktur enthält, welche einer Ras-Bindedomäne von Raf1 gleicht [97]. Werden in Raf1 Punktmutationen eingebracht, so führt dies zu einer verminderten Bindung an Ras [97, 121].

In Vorversuchen konnte Ras mit N-terminalem GST-Ezrin aus einem Zelllysats nachgewiesen werden, daher wurde eine Möglichkeit gesucht, diese Bindung genauer zu untersuchen.

Es war uns möglich, die in der Literatur beschriebenen Raf1-Mutationen [97, 121] auf die Ezrin-FERM-Domäne zu übertragen und eine Punktmutation zu finden (Ezrin R40L). Weitere Versuche mit diesem mutierten Ezrin-Protein (GST-Ezrin R40L) zeigten eine Inhibierung der Ras-Ezrin-Bindung. Da hier nur aufgereinigte Proteine verwendet wurden, kann daraus gefolgert werden, dass die Ras-Ezrin-Bindung direkt erfolgt.

Da Raf1 nur an GTP-gebundenes Ras binden kann, lag es nahe, auch im Falle von Ezrin eine Bindung an GTP-Ras zu vermuten. In einem Versuch, bei welchem GST-Ras entweder mit GDP oder mit GTP beladen wurde, konnte dies aber überraschenderweise nicht bestätigt werden. Nur GDP-beladenes Ras hatte die Fähigkeit an die FERM-Domäne von Wildtyp-Ezrin zu binden. Diese Bindung ließ sich mit der Ezrin-Mutation R40L inhibieren, hier konnte weder GDP-Ras, noch GTP-Ras binden. Des weiteren konnte ein negativer Einfluss von Ezrin R40L auf die Proliferation und die Aktivierung von Ras (GTP-Bindung) nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren gezeigt werden.

Wie und unter welchen Umständen eine Bindung von GDP-Ras an die FERM-Domäne von Ezrin erfolgt, konnte soweit noch nicht geklärt werden. Am Beispiel von Moesin konnte gezeigt werden, dass im inaktiven Zustand der α -helikale Teil die FERM-Domäne partiell maskiert [103]. Somit ist eine Bindung an GDP-Ras nur dann möglich, wenn eine Aktivierung und damit eine Konformationsänderung von Ezrin erfolgte. Dies ist beispielsweise durch Phosphorylierung möglich.

Es konnte schon gezeigt werden, dass erst die Phosphorylierung an Thr 567 die F-Aktin Bindung und damit eben auch eine Konformationsänderung ermöglicht [112], ob auch andere Phosphorylierungsstellen dabei eine Rolle spielen, ist nicht geklärt. Als alternative Phosphorylierungsstellen würden Tyr 145 und/oder Tyr 353 in Frage kommen [114, 115].

Offensichtlich ist die Struktur der Ezrin-Ras-Bindedomäne einer Raf-RBD sehr ähnlich, aber nicht identisch. Wäre dies der Fall, so müsste auch hier eine Bindung an GTP-Ras erfolgen. Warum allerdings nicht GTP-Ras sondern GDP-Ras an Ezrin bindet, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sagen. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt

sich aber schließen, dass die Bindung an GDP-beladenes Ras ein essentieller Schritt in der Aktivierung der Signalkaskade ist. Ohne die Bindung von Ezrin GDP-Ras ist Aktivierung von Ras (GTP-Beladung) nicht möglich.

Ein zusätzliche Bindung von Ras an SOS zur Aktivierung der GEF-Aktivität wurde schon beschrieben [38, 40]. Eine allosterisch gebundenes Ras zwischen der REM- und der Cdc25-Domäne ermöglicht eine Konformationsänderung von SOS [40, 41], welches dadurch erst seine Aktivität als GEF erlangt. Aber auch hier hätte GTP-Ras einen größeren Einfluss auf die GEF-Funktion von SOS [41]. Möglicherweise kann durch GDP-Ras die folgende Ras-Aktivierung und somit auch der Ras-MAP-Kinase Signalweg besser kontrolliert und reguliert werden.

Es war uns möglich neben der Bindung von GDP-Ras an SOS auch die Bindung von Ezrin selbst an SOS zu dokumentieren (Helen Morrison, nicht veröffentlicht). Diese Bindung findet zwischen dem Ezrin-C-Terminus und der DH-Domäne in SOS statt und konnte anhand Immunopräzipitationen und GEF-Assays belegt werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen und der verfügbaren Literatur lässt sich zunächst folgendes Modell darstellen: Je nach Wachstumsfaktor wird ein spezifischer Ko-Rezeptor aktiviert, welcher unter anderem die Aufgabe hat, die Wachstumsfaktoren an den jeweiligen Rezeptoren zu präsentieren [62, 63, 64], zusätzlich bindet am zytoplasmatischen Teil Ezrin/ERM an den Ko-Rezeptor. Durch Dimerisierung/Autophosphorylierung kann das Adaptor-Protein Grb 2 an die jeweilige RTK binden, welches dadurch den Kontakt zu SOS herstellen kann. Ein Austausch von GDP zu GTP an Ras kann allerdings erst dann erfolgen, wenn SOS als GEF aktiv ist. Dies geschieht nur, wenn GDP-gebundenes Ras zum einen an Ezrin und zum anderen an die REM/Cdc25-Domänen von SOS bindet (Helen Morrison, in Nachbearbeitung).

ERM-Proteine verbinden über Ko-Rezeptor-Bindung die Plasmamembran beziehungsweise die extrazelluläre Matrix (ECM) mit dem Inneren der Zelle. Auf diesem Weg ist es möglich, den Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg zu aktivieren. Dies geschieht aber nur dann, wenn ERMs selbst durch Phosphorylierung aktiviert wurden. Durch diese Aktivierung von ERMs erfolgt eine Konformationsänderung und F-Aktin kann binden, was für die Bindung an Ko-Rezeptoren und an SOS unerlässlich ist. Eine Aktivierung des Signalwegs ist aber auch in anderer Weise möglich. Schaut man sich die FERM-Domäne genauer an, so findet sich in dem 3-flügeligen Gebilde auch eine PH-Domäne, wie sie beispielsweise auch in SOS zu finden ist [99, 100, 101]. Diese ERM PH-Domäne kann an PIP₂ binden [88, 103, 136] und die ERM-Proteine können auch darüber aktiviert werden, um beispielsweise an CD44 zu binden [137, 66]. Durch die Bindung an PIP₂ kann ebenfalls eine Konformationsänderung in ERM-Proteinen ausgelöst werden, was die Voraussetzung für die Bindung an Ko-Rezeptoren ist. Dies würde bedeuten, dass eine Phosphorylierung von Ezrin an Position Thr 567 nicht mehr zwingend notwendig wäre.

Da PIP₂ ein Membranlipid ist, stellte sich für uns die Frage, ob eine direkte Bindung an die Plasmamembran ebenso eine Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs zur Folge hätte, wie es über die Phosphorylierung von Thr 567 der Fall ist. Um eine direkte Bindung in die Plasmamembran zu imitieren, wurde ein Myristoylierungsmotiv eingeführt [35].

5.3 Die direkte Membranbindung von Ezrin erlaubt eine dominant aktive Signalkaskade

Ob durch die direkte Membranbindung von Ezrin die Bindung zu Ko-Faktoren verloren geht, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Allerdings erfolgt eine Aktivierung des Ras-Signalwegs auch dann, wenn keine Stimulation – beispielsweise durch Wachstumsfaktoren im Serum – erfolgte. Werden die Zellen in serumfreiem Medium inkubiert und werden somit auch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren entzogen, hat dies zur Konsequenz, dass eine Aktivierung endogener ERM-Proteine nicht mehr erfolgen kann und nur die Aktivität zu messen ist, welche sich aus transfiziertem Ezrin ergibt. Aus den Ergebnissen der Versuche lässt sich daher ableiten, dass eine direkte Membranbindung von Ezrin offensichtlich in der konstitutiven Aktivierung des Ras/Raf/MEK/Erk-Signalwegs resultiert. Ob dabei die Bindung Ko-Rezeptoren eine Rolle spielt, konnte erst durch die Verwendung von spezifischer siRNA untersucht werden.

In Knock Down Experimenten, in welchem der für PDGF/PDGF-R spezifische Ko-Rezeptor ITG β -1 reduziert wurde, konnte gezeigt werden, dass trotz fehlenden Ko-Rezeptors eine konstitutiv aktivierte Signalkaskade erfolgte.

Zusammenfassend stellt sich die Frage, ob Ezrin durch diese alternative Form der Konformationsänderung/Aktivierung onkogene Eigenschaften hat, wie dies beispielsweise auch bei onkogenem, mutiertem Ras der Fall ist. Um dies zu testen, wäre eine Möglichkeit, anstatt im Zellmodell, in ein Tiermodell zu wechseln. Hier würden sich Nacktmäuse anbieten. Durch den fehlenden Thymus dieser Tiere und die dadurch resultierende fehlende Immunabwehr, könnten eventuelle onkogene Eigenschaften von Ezrin/ERM getestet werden.

5.4 Membrangebundenes Ezrin benötigt den N-Terminus um den Ras/MAP-Kinase Signalweg zu aktivieren

Für die bisher beschriebenen Experimente wurden zunächst nur Wildtyp-Formen der Ezrin-Proteine verwendet und es ergibt sich aus den Ergebnissen eine wesentliche Frage: Erfolgt auch im Falle der direkten Membranbindung von Ezrin eine Bindung von GDP-Ras an die FERM-Domäne? Diese Frage konnte durch die Verwendung eines verkürzten

Ezrin-Proteins teilweise geklärt werden.

Wird membrangebundenes Ezrin um den N-Terminus verkürzt, dann kann das Protein weder an Ko-Rezeptoren, noch an GDP-Ras binden. Eine Beteiligung der Ko-Rezeptoren an der Aktivierung des Ras-MAP-Kinase Signalwegs im Falle der lipidmodifizierten Ezrin-Proteine kann aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse ausgeschlossen werden, da auch nach Ko-Rezeptor Knock Down eine konstitutiv Aktivierung des Signalwegs nachgewiesen wurde. Somit war zu klären, ob beispielsweise die GDP-Ras Bindung an Ezrin essentiell für die Aktivierung des Signalwegs wäre.

Es zeigte sich, dass im Falle des verkürzten Ezrin-Proteins eine konstitutive Aktivierung des Ras-Signalwegs nicht mehr erkennbar war, beziehungsweise sogar eine Inhibierung der Ras-Aktivierung nachzuweisen war. Daraus lässt sich folgern, dass der Ezrin N-Terminus essentiell für die Aktivierung der Signalkaskade ist. Ob dies nun aufgrund der nicht erfolgten GDP-Ras Bindung an Ezrin geschah, oder ob eine Bindung von Ezrin an SOS ohne GDP-Ras erfolgen kann, ist noch nicht geklärt. Eine Bindung an SOS ist auch dann möglich, wenn nur der C-Terminus von Ezrin vorhanden ist (Helen Morrison, nicht veröffentlicht). So könnte man die Ergebnisse der Versuche darauf zurückführen, dass SOS aus dem System abgefangen wird und sich das Gleichgewicht der verfügbaren Proteine verschiebt. Dadurch kann SOS seine Funktion als GEF nicht mehr wahrnehmen, da die Konformationsänderung an SOS durch allosterisch gebundenes GDP-Ras nicht mehr erfolgen kann.

6 Literaturverzeichnis

- [1] O. Kranenburg and W. H. Moolenaar. Ras-map kinase signaling by lysophosphatidic acid and other g protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, 20(13):1540–1546, Mar 2001.
- [2] F. McCormick. Signal transduction. how receptors turn ras on. *Nature*, 363(6424):15–16, May 1993.
- [3] C. Shih, B. Z. Shilo, M. P. Goldfarb, A. Dannenberg, and R. A. Weinberg. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of dna and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(11):5714–5718, Nov 1979.
- [4] M. Perucho, M. Goldfarb, K. Shimizu, C. Lama, J. Fogh, and M. Wigler. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell*, 27(3 Pt 2):467–476, Dec 1981.
- [5] D. Bar-Sagi and J. R. Feramisco. Microinjection of the ras oncogene protein into pc12 cells induces morphological differentiation. *Cell*, 42(3):841–848, Oct 1985.
- [6] D. Bar-Sagi and J. R. Feramisco. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*, 233(4768):1061–1068, Sep 1986.
- [7] A. Kauffmann-Zeh, P. Rodriguez-Viciano, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, and G. Evan. Suppression of c-myc-induced apoptosis by ras signalling through pi(3)k and pkb. *Nature*, 385(6616):544–548, Feb 1997.
- [8] Peiqing Sun, Naoto Yoshizuka, Liguang New, Bettina A Moser, Yilei Li, Rong Liao, Changchuan Xie, Jianming Chen, Qingdong Deng, Maria Yamout, Meng-Qiu Dong, Costas G Frangou, John R Yates, Peter E Wright, and Jiahuai Han. Prak is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, 128(2):295–308, Jan 2007.
- [9] J. Omerovic, A. J. Laude, and I. A. Prior. Ras proteins: paradigms for compartmentalised and isoform-specific signalling. *Cell Mol Life Sci*, 64(19-20):2575–2589, Oct 2007.

- [10] J. Downward, J. D. Graves, P. H. Warne, S. Rayter, and D. A. Cantrell. Stimulation of p21ras upon t-cell activation. *Nature*, 346(6286):719–723, Aug 1990.
- [11] K. M. Mulder and S. L. Morris. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem*, 267(8):5029–5031, Mar 1992.
- [12] J. B. Gibbs, M. S. Marshall, E. M. Scolnick, R. A. Dixon, and U. S. Vogel. Modulation of guanine nucleotides bound to ras in nih3t3 cells by oncogenes, growth factors, and the gtpase activating protein (gap). *J Biol Chem*, 265(33):20437–20442, Nov 1990.
- [13] T. Satoh, M. Endo, M. Nakafuku, S. Nakamura, and Y. Kaziro. Platelet-derived growth factor stimulates formation of active p21ras.gtp complex in swiss mouse 3t3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15):5993–5997, Aug 1990.
- [14] D. R. Lowy and B. M. Willumsen. Protein modification: new clue to ras lipid glue. *Nature*, 341(6241):384–385, Oct 1989.
- [15] J. F. Hancock, A. I. Magee, J. E. Childs, and C. J. Marshall. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, 57(7):1167–1177, Jun 1989.
- [16] W. K. Schmidt, A. Tam, K. Fujimura-Kamada, and S. Michaelis. Endoplasmic reticulum membrane localization of rce1p and ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal caax protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11175–11180, Sep 1998.
- [17] Q. Dai, E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, and M. R. Philips. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 273(24):15030–15034, Jun 1998.
- [18] Janice C Wolfman, Sarah M Planchon, Jinhui Liao, and Alan Wolfman. Structural and functional consequences of c-n-ras constitutively associated with intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1763(10):1108–1124, Oct 2006.
- [19] Krishnaraj Rajalingam, Ralf Schreck, Ulf R Rapp, and Stefan Albert. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8):1177–1195, Aug 2007.
- [20] J. F. Hancock, H. Paterson, and C. J. Marshall. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the caax motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, 63(1):133–139, Oct 1990.

- [21] A. Apolloni, I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, and J. F. Hancock. H-ras but not k-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol*, 20(7):2475–2487, Apr 2000.
- [22] E. Choy, V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, and M. R. Philips. Endomembrane trafficking of ras: the caax motif targets proteins to the er and golgi. *Cell*, 98(1):69–80, Jul 1999.
- [23] P. J. Roberts and C. J. Der. Targeting the raf-mek-erk mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22):3291–3310, May 2007.
- [24] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, and A. Wittinghofer. The ras-rasgap complex: structural basis for gtpase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science*, 277(5324):333–338, Jul 1997.
- [25] F. Wittinghofer. Ras signalling. caught in the act of the switch-on. *Nature*, 394(6691):317, 319–317, 320, Jul 1998.
- [26] M. Geyer and A. Wittinghofer. Gef's, gaps, gdis and effectors: taking a closer (3d) look at the regulation of ras-related gtp-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 7(6):786–792, Dec 1997.
- [27] H. J. Schaeffer and M. J. Weber. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 19(4):2435–2444, Apr 1999.
- [28] D. K. Morrison and R. E. Cutler. The complexity of raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9(2):174–179, Apr 1997.
- [29] A. Kikuchi and L. T. Williams. The post-translational modification of ras p21 is important for raf-1 activation. *J Biol Chem*, 269(31):20054–20059, Aug 1994.
- [30] Amardeep S Dhillon and Walter Kolch. Untying the regulation of the raf-1 kinase. *Arch Biochem Biophys*, 404(1):3–9, Aug 2002.
- [31] M. A. Simon, D. D. Bowtell, G. S. Dodson, T. R. Laverty, and G. M. Rubin. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*, 67(4):701–716, Nov 1991.
- [32] L. Bonfini, C. A. Karlovich, C. Dasgupta, and U. Banerjee. The son of sevenless gene product: a putative activator of ras. *Science*, 255(5044):603–606, Jan 1992.

- [33] R. D. Rogge, C. A. Karlovich, and U. Banerjee. Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and egf receptor tyrosine kinases. *Cell*, 64(1):39–48, Jan 1991.
- [34] P. Chardin, J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler, and D. Bar-Sagi. Human sos1: a guanine nucleotide exchange factor for ras that binds to grb2. *Science*, 260(5112):1338–1343, May 1993.
- [35] A. Aronheim, D. Engelberg, N. Li, N. al Alawi, J. Schlessinger, and M. Karin. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor sos is sufficient for activating the ras signaling pathway. *Cell*, 78(6):949–961, Sep 1994.
- [36] Holger Sondermann, Bhushan Nagar, Dafna Bar-Sagi, and John Kuriyan. Computational docking and solution x-ray scattering predict a membrane-interacting role for the histone domain of the ras activator son of sevenless. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(46):16632–16637, Nov 2005.
- [37] Anjaruwee Nimnual and Dafna Bar-Sagi. The two hats of sos. *Sci STKE*, 2002(145):PE36, Aug 2002.
- [38] Tanya S Freedman, Holger Sondermann, Gregory D Friedland, Tanja Kortemme, Dafna Bar-Sagi, Susan Marqusee, and John Kuriyan. A ras-induced conformational switch in the ras activator son of sevenless. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(45):16692–16697, Nov 2006.
- [39] J. H. Kim, M. Shirouzu, T. Kataoka, D. Bowtell, and S. Yokoyama. Activation of ras and its downstream extracellular signal-regulated protein kinases by the cdc25 homology domain of mouse son-of-sevenless 1 (msos1). *Oncogene*, 16(20):2597–2607, May 1998.
- [40] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. The structural basis of the activation of ras by sos. *Nature*, 394(6691):337–343, Jul 1998.
- [41] S. Mariana Margarit, Holger Sondermann, Brian E Hall, Bhushan Nagar, Andre Hoelz, Michelle Pirruccello, Dafna Bar-Sagi, and John Kuriyan. Structural evidence for feedback activation by ras.gtp of the ras-specific nucleotide exchange factor sos. *Cell*, 112(5):685–695, Mar 2003.
- [42] Holger Sondermann, Stephen M Soisson, Sean Boykevich, Shao-Song Yang, Dafna Bar-Sagi, and John Kuriyan. Structural analysis of autoinhibition in the ras activator son of sevenless. *Cell*, 119(3):393–405, Oct 2004.

- [43] L. Buday and J. Downward. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, grb2 adapter protein, and sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 73(3):611–620, May 1993.
- [44] S. E. Egan, B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland, and R. A. Weinberg. Association of sos ras exchange protein with grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, 363(6424):45–51, May 1993.
- [45] N. Li, A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis, and J. Schlessinger. Guanine-nucleotide-releasing factor hsos1 binds to grb2 and links receptor tyrosine kinases to ras signalling. *Nature*, 363(6424):85–88, May 1993.
- [46] J. Schlessinger. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2):211–225, Oct 2000.
- [47] Tony Pawson. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*, 38 Suppl 5:S3–10, Sep 2002.
- [48] G. D. Plowman, S. Sudarsanam, J. Bingham, D. Whyte, and T. Hunter. The protein kinases of caenorhabditis elegans: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24):13603–13610, Nov 1999.
- [49] D. R. Robinson, Y. M. Wu, and S. F. Lin. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49):5548–5557, Nov 2000.
- [50] T. Hunter. The croonian lecture 1997. the phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1368):583–605, Apr 1998.
- [51] C. H. Heldin. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, 80(2):213–223, Jan 1995.
- [52] G. Jiang and T. Hunter. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol*, 9(15):R568–R571, 1999.
- [53] M. Klagsbrun and A. Baird. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell*, 67(2):229–231, Oct 1991.
- [54] F. López-Casillas, J. L. Wrana, and J. Massagué. Betaglycan presents ligand to the tgf beta signaling receptor. *Cell*, 73(7):1435–1444, Jul 1993.

- [55] A. Yayon, M. Klagsbrun, J. D. Esko, P. Leder, and D. M. Ornitz. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, 64(4):841–848, Feb 1991.
- [56] M. Roghani, A. Mansukhani, P. Dell’Era, P. Bellosta, C. Basilico, D. B. Rifkin, and D. Moscatelli. Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem*, 269(6):3976–3984, Feb 1994.
- [57] I. J. Mason. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell*, 78(4):547–552, Aug 1994.
- [58] D. M. Ornitz. Fgfs, heparan sulfate and fgfrs: complex interactions essential for development. *Bioessays*, 22(2):108–112, Feb 2000.
- [59] D. M. Ornitz, A. Yayon, J. G. Flanagan, C. M. Svahn, E. Levi, and P. Leder. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol*, 12(1):240–247, Jan 1992.
- [60] J. M. Kaplow, F. Bellot, G. Crumley, C. A. Dionne, and M. Jaye. Effect of heparin on the binding affinity of acidic fgf for the cloned human fgf receptors, flg and bek. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(1):107–112, Oct 1990.
- [61] M. W. Pantoliano, R. A. Horlick, B. A. Springer, D. E. Van Dyk, T. Tobery, D. R. Wetmore, J. D. Lear, A. T. Nahapetian, J. D. Bradley, and W. P. Sisk. Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerization. *Biochemistry*, 33(34):10229–10248, Aug 1994.
- [62] J. Schlessinger, I. Lax, and M. Lemmon. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, 83(3):357–360, Nov 1995.
- [63] L. Sherman, D. Wainwright, H. Ponta, and P. Herrlich. A splice variant of cd44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth. *Genes Dev*, 12(7):1058–1071, Apr 1998.
- [64] L. Pellegrini. Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol*, 11(5):629–634, Oct 2001.

- [65] S. Tsukita, K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai, and S. Tsukita. Erm family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein cd44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol*, 126(2):391–401, Jul 1994.
- [66] M. Hirao, N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, S. Tsukita, and S. Tsukita. Regulation mechanism of erm (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol*, 135(1):37–51, Oct 1996.
- [67] D. Naor, R. V. Sionov, and D. Ish-Shalom. Cd44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*, 71:241–319, 1997.
- [68] G. Borland, J. A. Ross, and K. Guy. Forms and functions of cd44. *Immunology*, 93(2):139–148, Feb 1998.
- [69] Helmut Ponta, Larry Sherman, and Peter A Herrlich. Cd44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(1):33–45, Jan 2003.
- [70] Véronique Orian-Rousseau, Linfeng Chen, Jonathan P Sleeman, Peter Herrlich, and Helmut Ponta. Cd44 is required for two consecutive steps in hgf/c-met signaling. *Genes Dev*, 16(23):3074–3086, Dec 2002.
- [71] S. Yonemura, M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, S. Tsukita, and S. Tsukita. Ezrin/radixin/moesin (erm) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of cd44, cd43, and icam-2. *J Cell Biol*, 140(4):885–895, Feb 1998.
- [72] J. W. Legg and C. M. Isacke. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, cd44. *Curr Biol*, 8(12):705–708, Jun 1998.
- [73] Rick F Thorne, James W Legg, and Clare M Isacke. The role of the cd44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci*, 117(Pt 3):373–380, Jan 2004.
- [74] Véronique Orian-Rousseau, Helen Morrison, Alexandra Matzke, Thor Kastilan, Giuseppina Pace, Peter Herrlich, and Helmut Ponta. Hepatocyte growth factor-induced ras activation requires erm proteins linked to both cd44v6 and f-actin. *Mol Biol Cell*, 18(1):76–83, Jan 2007.
- [75] Helen Morrison, Tobias Sperka, Jan Manent, Marco Giovannini, Helmut Ponta, and Peter Herrlich. Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of ras and rac. *Cancer Res*, 67(2):520–527, Jan 2007.

- [76] K. L. Gould, A. Bretscher, F. S. Esch, and T. Hunter. cdna cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1. *EMBO J*, 8(13):4133–4142, Dec 1989.
- [77] O. Turunen, R. Winqvist, R. Pakkanen, K. H. Grzeschik, T. Wahlström, and A. Vaheri. Cytovillin, a microvillar mr 75,000 protein. cdna sequence, prokaryotic expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 264(28):16727–16732, Oct 1989.
- [78] P. H. Rao, V. V. Murty, G. Gaidano, R. Hauptschein, R. Dalla-Favera, and R. S. Chaganti. Subregional mapping of 8 single copy loci to chromosome 6 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 66(4):272–273, 1994.
- [79] P. Majander-Nordenswan, M. Sainio, O. Turunen, J. Jääskeläinen, O. Carpén, J. Kere, and A. Vaheri. Genomic structure of the human ezrin gene. *Hum Genet*, 103(6):662–665, Dec 1998.
- [80] N. Sato, N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci*, 103 (Pt 1):131–143, Sep 1992.
- [81] A. Bretscher. Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol*, 97(2):425–432, Aug 1983.
- [82] R. Pakkanen, K. Hedman, O. Turunen, T. Wahlström, and A. Vaheri. Microvillus-specific mr 75,000 plasma membrane protein of human choriocarcinoma cells. *J Histochem Cytochem*, 35(8):809–816, Aug 1987.
- [83] K. L. Gould, J. A. Cooper, A. Bretscher, and T. Hunter. The protein-tyrosine kinase substrate, p81, is homologous to a chicken microvillar core protein. *J Cell Biol*, 102(2):660–669, Feb 1986.
- [84] M. Berryman, Z. Franck, and A. Bretscher. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci*, 105 (Pt 4):1025–1043, Aug 1993.
- [85] S. Tsukita, Y. Hieda, and S. Tsukita. A new 82-kd barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J Cell Biol*, 108(6):2369–2382, Jun 1989.

- [86] W. Lankes, A. Griesmacher, J. Grünwald, R. Schwartz-Albiez, and R. Keller. A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. *Biochem J*, 251(3):831–842, May 1988.
- [87] Anthony Bretscher, Kevin Edwards, and Richard G Fehon. Erm proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(8):586–599, Aug 2002.
- [88] M. Algrain, O. Turunen, A. Vaheri, D. Louvard, and M. Arpin. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol*, 120(1):129–139, Jan 1993.
- [89] Shojiro Kikuchi, Masaki Hata, Kanehisa Fukumoto, Yukari Yamane, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Shigenobu Yonemura, Hisakazu Yamagishi, Dietrich Keppeler, Shoichiro Tsukita, and Sachiko Tsukita. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet*, 31(3):320–325, Jul 2002.
- [90] Ichiko Saotome, Marcello Curto, and Andrea I McClatchey. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell*, 6(6):855–864, Jun 2004.
- [91] Kathryn G Miller. A role for moesin in polarity. *Trends Cell Biol*, 13(4):165–168, Apr 2003.
- [92] Cédric Polesello, Isabelle Delon, Philippe Valenti, Pierre Ferrer, and François Payre. Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during drosophila melanogaster oogenesis. *Nat Cell Biol*, 4(10):782–789, Oct 2002.
- [93] K. Hamada, T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita, and T. Hakoshima. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin ferm domain. *EMBO J*, 19(17):4449–4462, Sep 2000.
- [94] M. A. Pearson, D. Reczek, A. Bretscher, and P. A. Karplus. Structure of the erm protein moesin reveals the ferm domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*, 101(3):259–270, Apr 2000.
- [95] William James Smith, Nicolas Nassar, Anthony Bretscher, Richard A Cerione, and P. Andrew Karplus. Structure of the active n-terminal domain of ezrin. conformational and mobility changes identify keystone interactions. *J Biol Chem*, 278(7):4949–4956, Feb 2003.

- [96] S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, and W. J. Cook. Structure of ubiquitin refined at 1.8 a resolution. *J Mol Biol*, 194(3):531–544, Apr 1987.
- [97] N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, A. Scherer, F. McCormick, and A. Wittinghofer. The 2.2 a crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-rafl in complex with rap1a and a gtp analogue. *Nature*, 375(6532):554–560, Jun 1995.
- [98] B. B. Kragelund, K. V. Andersen, J. C. Madsen, J. Knudsen, and F. M. Poulsen. Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme a binding protein and palmitoyl-coenzyme a. *J Mol Biol*, 230(4):1260–1277, Apr 1993.
- [99] K. M. Ferguson, M. A. Lemmon, J. Schlessinger, and P. B. Sigler. Crystal structure at 2.2 a resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell*, 79(2):199–209, Oct 1994.
- [100] S. M. Soisson, A. S. Nimnual, M. Uy, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. Crystal structure of the dbl and pleckstrin homology domains from the human son of sevenless protein. *Cell*, 95(2):259–268, Oct 1998.
- [101] M. M. Zhou, K. S. Ravichandran, E. F. Olejniczak, A. M. Petros, R. P. Meadows, M. Sattler, J. E. Harlan, W. S. Wade, S. J. Burakoff, and S. W. Fesik. Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of shc. *Nature*, 378(6557):584–592, Dec 1995.
- [102] Keisuke Hamada, Toshiyuki Shimizu, Shigenobu Yonemura, Shoichiro Tsukita, Sachiko Tsukita, and Toshio Hakoshima. Structural basis of adhesion-molecule recognition by erm proteins revealed by the crystal structure of the radixin-icam-2 complex. *EMBO J*, 22(3):502–514, Feb 2003.
- [103] Qianzhi Li, Mark R Nance, Rima Kulikauskas, Kevin Nyberg, Richard Fehon, P. Andrew Karplus, Anthony Bretscher, and John J G Tesmer. Self-masking in an intact erm-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *J Mol Biol*, 365(5):1446–1459, Feb 2007.
- [104] F. Nakamura, L. Huang, K. Pestonjamas, E. J. Luna, and H. Furthmayr. Regulation of f-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol Biol Cell*, 10(8):2669–2685, Aug 1999.
- [105] R. Gary and A. Bretscher. Ezrin self-association involves binding of an n-terminal domain to a normally masked c-terminal domain that includes the f-actin binding site. *Mol Biol Cell*, 6(8):1061–1075, Aug 1995.

- [106] M. Magendantz, M. D. Henry, A. Lander, and F. Solomon. Interdomain interactions of radixin in vitro. *J Biol Chem*, 270(43):25324–25327, Oct 1995.
- [107] D. T. Dransfield, A. J. Bradford, J. Smith, M. Martin, C. Roy, P. H. Mangeat, and J. R. Goldenring. Ezrin is a cyclic amp-dependent protein kinase anchoring protein. *EMBO J*, 16(1):35–43, Jan 1997.
- [108] T. Matsui, M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, and S. Tsukita. Rho-kinase phosphorylates cooh-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (erm) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*, 140(3):647–657, Feb 1998.
- [109] C. Tran Quang, A. Gautreau, M. Arpin, and R. Treisman. Ezrin function is required for rock-mediated fibroblast transformation by the net and dbl oncogenes. *EMBO J*, 19(17):4565–4576, Sep 2000.
- [110] T. Ng, M. Parsons, W. E. Hughes, J. Monypenny, D. Zicha, A. Gautreau, M. Arpin, S. Gschmeissner, P. J. Verveer, P. I. Bastiaens, and P. J. Parker. Ezrin is a downstream effector of trafficking pkc-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J*, 20(11):2723–2741, Jun 2001.
- [111] S. F. Pietromonaco, P. C. Simons, A. Altman, and L. Elias. Protein kinase c-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem*, 273(13):7594–7603, Mar 1998.
- [112] P. C. Simons, S. F. Pietromonaco, D. Reczek, A. Bretscher, and L. Elias. C-terminal threonine phosphorylation activates erm proteins to link the cell’s cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(3):561–565, Dec 1998.
- [113] J. Krieg and T. Hunter. Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem*, 267(27):19258–19265, Sep 1992.
- [114] J. Srivastava, B. E. Elliott, D. Louvard, and M. Arpin. Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. *Mol Biol Cell*, 16(3):1481–1490, Mar 2005.
- [115] Richard Monni, Lamya Haddaoui, Alexandra Naba, Isabelle Gallais, Monique Arpin, Patrick Mayeux, and Francoise Moreau-Gachelin. Ezrin is a target for oncogenic kit mutants in murine erythroleukemia. *Blood*, Jan 2008.

- [116] J. M. Serrador, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano, and F. Sánchez-Madrid. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of t lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol*, 138(6):1409–1423, Sep 1997.
- [117] J. M. Serrador, M. Nieto, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. González-Amaro, P. Sánchez-Mateos, and F. Sánchez-Madrid. Cd43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of t lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood*, 91(12):4632–4644, Jun 1998.
- [118] L. Heiska, K. Alfthan, M. Grönholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpén. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (icam-1 and icam-2). regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 273(34):21893–21900, Aug 1998.
- [119] T. S. Helander, O. Carpén, O. Turunen, P. E. Kovanen, A. Vaheri, and T. Timonen. Icam-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature*, 382(6588):265–268, Jul 1996.
- [120] J. Klominek, B. Baskin, and D. Hauzenberger. Platelet-derived growth factor (pdgf) bb acts as a chemoattractant for human malignant mesothelioma cells via pdgf receptor beta-integrin alpha3beta1 interaction. *Clin Exp Metastasis*, 16(6):529–539, Aug 1998.
- [121] C. Block, R. Janknecht, C. Herrmann, N. Nassar, and A. Wittinghofer. Quantitative structure-activity analysis correlating ras/raf interaction in vitro to raf activation in vivo. *Nat Struct Biol*, 3(3):244–251, Mar 1996.
- [122] R. Janknecht, W. H. Ernst, V. Pingoud, and A. Nordheim. Activation of ternary complex factor elk-1 by map kinases. *EMBO J*, 12(13):5097–5104, Dec 1993.
- [123] J. Gerdes, U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31(1):13–20, Jan 1983.
- [124] T. Scholzen and J. Gerdes. The ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3):311–322, Mar 2000.
- [125] Guy Tanentzapf and Nicholas H Brown. An interaction between integrin and the talin ferm domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 8(6):601–606, Jun 2006.

-
- [126] R. C. Bates, L. F. Lincz, and G. F. Burns. Involvement of integrins in cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, 14(3):191–203, Sep 1995.
- [127] N. J. Boudreau and P. L. Jones. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J*, 339 (Pt 3):481–488, May 1999.
- [128] J. L. Guan and H. C. Chen. Signal transduction in cell-matrix interactions. *Int Rev Cytol*, 168:81–121, 1996.
- [129] R. O. Hynes. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48(4):549–554, Feb 1987.
- [130] M. Hellström, M. Kalén, P. Lindahl, A. Abramsson, and C. Betsholtz. Role of pdgf-b and pdgfr-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14):3047–3055, Jun 1999.
- [131] C. Betsholtz, L. Karlsson, and P. Lindahl. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*, 23(6):494–507, Jun 2001.
- [132] Desiree von Tell, Annika Armulik, and Christer Betsholtz. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res*, 312(5):623–629, Mar 2006.
- [133] J. T. Yang, H. Rayburn, and R. O. Hynes. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development*, 119(4):1093–1105, Dec 1993.
- [134] Richard O Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, Sep 2002.
- [135] Kate L Wegener, Anthony W Partridge, Jaewon Han, Andrew R Pickford, Robert C Liddington, Mark H Ginsberg, and Iain D Campbell. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, 128(1):171–182, Jan 2007.
- [136] T. Matsui, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. Activation of erm proteins in vivo by rho involves phosphatidyl-inositol 4-phosphate 5-kinase and not rock kinases. *Curr Biol*, 9(21):1259–1262, Nov 1999.
- [137] V. Niggli, C. Andréoli, C. Roy, and P. Mangeat. Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the n-terminal region of ezrin. *FEBS Lett*, 376(3):172–176, Dec 1995.

A Anhang

A.1 Allgemeine Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
C-Terminal	Carboxy-Terminal
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCS	engl. Donor Calf Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. enhanced chemofluorescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FBS	engl. Fetal Bovine Serum
G 418	Geneticin
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerretich Peroxidase (engl. horse raddish peroxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
N-Terminal	Amino-Terminal
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDGF	engl. platelet derived growth factor

PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	engl. Tris buffered saline/Tween20
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

A.2 Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leuzin
M	Met	Methionin
N	Apn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

A.3 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtliches oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde nach bestem Wissen als solches gekennzeichnet.

Mir ist die geltende Promotionsordnung der FSU Jena bekannt. Ich habe die Dissertation selbst angefertigt und habe alle von mir benutzte Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben. Ich habe keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen. Gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung wurden von mir bei noch keiner anderen Hochschule eingereicht.

Ulrike Merkel, März 2008

A.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz Institut für Altersforschung - Fritz Lipmann Institut (FLI) durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Herrlich möchte ich danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe die Arbeit beginnen durfte.

Frau Dr. Helen Morrison möchte ich für das interessante Thema und für die große Unterstützung und ihre Geduld während der Promotion danken. Auch wenn es nicht immer einfach war –*It's easy*.

Weiterer Dank geht an die Mitglieder und die ehemaligen Mitglieder der Labore 204, 211 & 212 und für die Unterstützung die mir zuteil wurde.

Mein besonderer Dank geht an Anett, die mir eine gute Freundin und Kollegin ist und mit der ich viele Diskussionen führte.

Außerdem möchte ich ganz besonders meiner Familie danken. Meinem Vater und meiner verstorbenen Mutter, die mir ein Beginnen und auch oftmals ein Fortführen des Studiums ermöglicht haben. Meiner Schwester Renate, die mich mit Vitaminen versorgte und meinem Bruder Klaus, der sich um wiederholten Mal mit meinen Computerproblemen auseinander setzen musste.

Nicht zuletzt möchte ich Dr. Agnes Lovas danken, die immer für mich da war und die mir - nicht nur - seelischen Beistand leistete.

A.5 Lebenslauf

Perönliche Daten

Geboren am	25. August 1965 in Heidelberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

1971 – 1975	Neuberg Grundschule in Dossenheim
1975 – 1982	Kurpfalz Realschule in Schriesheim Abschluss: Mittlere Reife
1994 – 1997	Staatliches Speyer Kolleg in Speyer Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

1982 – 1986	Ausbildung zur Chemielaborantin am DKFZ in Heidelberg
-------------	--

Berufserfahrung

1986 – 1987	Arbeitsverhältnis am DKFZ als Chemielaborantin
1987 – 1988	Arbeitsverhältnis am DKFZ/Universität Heidelberg als Chemielaborantin
1988 – 1992	Tätigkeiten im sozialen Sektor: Sozialstation Heidelberg-Handschuhsheim; Roll In e.V. in Mannheim
1992	Fahrerin bei Ehrenfried-Betriebe in Heidelberg
1992 – 1994	Selbständig

Studium

1997 – 2003	Biologiestudium an der Universität in Karlsruhe 1. Hauptfach: Genetik, Abschlussnote: 2,0 2. Hauptfach: Botanik, Abschlussnote: 1,7 1. Nebenfach: Umwelt- und Strahlentoxikologie, Abschlussnote: 1,3 2. Nebenfach: Organische Chemie, Abschlussnote: 2,0
7. Januar 2003	Diplomarbeit im Forschungszentrum Karlsruhe (FZK) „Die Regulation von Mdm2 nach ultravioletter Strahlung“ Arbeitsgruppe: Professor Dr. P. Herrlich
25. November 2003	Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin, Gesamtnote: 2,2
1. Mai 2004	Beginn der Doktorarbeit am Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung (FLI) in Jena (früher Institut für molekulare Biotechnologie (IMB)) „Ezrin/F-Aktin und Signaltransduktion“ Arbeitsgruppe: Dr. Helen Morrison (früher Professor Dr. P. Herrlich)
17. September 2008	Disputation

EDV-Kenntnisse

Textverarbeitung	LaTeX; AppleWorks; Microsoft Word
Tabellenkalkulation	AppleWorks; Microsoft Excel
Grafik	Adobe Photoshop; ACD Canvas; Microsoft Powerpoint
Bibliografie	EndNote; JabRef

Sprachen

Englisch (sehr gut)
Französisch (Schulkenntnisse)

A.6 Poster-Präsentationen

Juni 2006	Bad Blankenburg im Rahmen der FLI Klausurtagung
Juni 2007	Bad Blankenburg im Rahmen der FLI Klausurtagung
September 2007	Spetses Summer School (Griechenland)

A.7 Vorträge & Veröffentlichungen

Vorträge:

November 2006; AP-1 Meeting, Siena (Italien)

Veröffentlichungen:

Henri Saleh, **Ulrike Merkel**, Katja Geißler, Tobias Sperka, Antonio Sechi, Constanze Breithaupt and Helen Morrison. Properties of an ezrin mutant defective in F-actin binding. *Journal of Molecular Biology*. Akzeptiert im November 2008

Helen Morrison, Tobias Sperka, Ingmar Scholl, **Ulrike Merkel**, Ignacio Rubio, Henri Saleh, Jin Hongchuan, and Peter Herrlich. Regulated Release of Auto-Inhibition of Son of Sevenless (SOS) by Ezrin-Actin. *Nature*. (In Nachbearbeitung)

Ulrike Merkel, Irina Gier, Henri Saleh, Helen Morrison. Membrane targeting of Ezrin is sufficient for activating the Ras signaling pathway. (In Bearbeitung)